

Departamento de Microbiología y Parasitología
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



TESIS DOCTORAL

**Regulación de la expresión
génica en respuesta a inhibidores
de β -1,3-glucán sintasa
en *Saccharomyces cerevisiae***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Enrique Bravo Fernández

DIRECTORES

Francisco Javier Arroyo Nombela

José Manuel Rodríguez Peña

Madrid

Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Regulación de la expresión génica en respuesta a inhibidores de β - 1,3-glucán sintasa en *Saccharomyces cerevisiae*

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por
ENRIQUE BRAVO FERNÁNDEZ

Directores

**FRANCISCO JAVIER ARROYO NOMBELA
JOSE MANUEL RODRÍGUEZ PEÑA**

Madrid, 2018

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

- Un contrato otorgado por la Cátedra Extraordinaria de Genómica y Proteómica de la UCM durante el año 2010.
- Una beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador otorgada del Ministerio de Ciencia e Innovación durante el periodo 2011-2015.
- El Proyecto de Investigación “Reguladores, efectores y conexión entre rutas de señalización implicadas en la integridad celular de la levadura: aproximación a la identificación de nuevas dianas antifúngicas” BIO2010-22146 subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2011-2013).
- El Proyecto de Investigación “Mantenimiento de la integridad celular en situaciones de estrés: control de la expresión génica por la ruta de integridad mediada por la MAPK Slt2 en levadura” BIO2013-48136-P subvencionado el Ministerio de Economía y Competitividad (2014-2016).

DOÑA GLORIA MOLERO MARTÍN-PORTUGUÉS, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que ENRIQUE BRAVO FERNÁNDEZ ha realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los doctores Francisco Javier Arroyo Nombela y José Manuel Rodríguez Peña, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

“Regulación de la expresión génica en respuesta a inhibidores de β -1,3-glucán sintasa en *Saccharomyces cerevisiae*”

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, a 6 de julio de 2018.

Fdo. Dra. Gloria Molero Martín-Portugués

Al abu...

GRACIAS

Siempre he pensado, al menos en mí caso así ha sido, que el momento de escribir los agradecimientos en una tesis es algo que desde el comienzo del doctorado has ido diseñando mentalmente. Y sin embargo, cuando de verdad llega el momento, te ves que no te salen demasiado las palabras, que es imposible en un par de folios transmitir el reconocimiento a tantas y tantas personas, por tantos y tantos momentos, que han hecho posible que lo que vais a leer en este ejemplar haya sido posible.

Así que voy a empezar por las dos personas a las que debo todo esto, por Javier y Jose, los directores de esta tesis. A Javier quiero agradecerle la oportunidad que me ha dado de formar parte de su grupo de investigación, en el que tanto he aprendido. Gracias por su confianza, por su apoyo, y por supuesto, gracias por su ayuda en los experimentos bastante complicados de la medida del AMP cíclico intracelular, en los que no dudó en ponerse su bata y sus guantes y acompañarme en mi poyata en todo momento. Además, también quiero agradecerle los consejos que me ha dado, muchos de ellos fuera del ámbito científico, y cuya puesta en práctica me han facilitado bastante las cosas. Gracias a Jose por todo, por todo lo que por descontado se debe agradecer a un director de tesis, pero muy especialmente gracias por su paciencia, por las horas y horas que me ha dedicado y por saber gestionar mi impulsividad de una forma tan especial.

Gracias también al Doctor Cesar Nombela por su confianza durante mi proceso de incorporación y por sus gestiones para asegurar mi cobertura económica en la etapa previa a la obtención de la beca FPI. A las tres directoras del Departamento de Microbiología que han ejercido su cargo durante la realización de esta tesis, las Doctoras María Molina, Concha Gil y Gloria Molero, por haberme facilitado tanto las cosas y por haber hecho del Departamento un lugar en el que ha sido un gustazo trabajar. A los Doctores Jesús Plá, Rebeca Alonso, Humberto Martín, Victor J Cid, Rosalía Díez, Lucía Monteoliva y Federico Navarro por haberme contagiado su pasión por la ciencia y, por qué no decirlo, por hacer tan agradables las jornadas laborales. A las Doctoras Carmen de la Rosa, Conchita Pintado y Carmina Rodríguez por su cariño, por su esfuerzo por hacerme sentir siempre bien y por ser el mejor ejemplo de lo que es amar la microbiología. Gracias también a Jesús, Pedro y Rosa, de la Unidad de Genómica, por su colaboración en los análisis de expresión génica.

Gracias a la Doctora María Ángeles de la Torre por su ayuda y sus consejos sobre los experimentos de acumulación de glucógeno y medición de AMP cíclico intracelular. Y gracias por el *paper* de Mtl1, que sin duda ha sido lo que llamaríamos mi "*paper* de cabecera".

Por supuesto, gracias a mi "mentor" Raúl. Con Raúl me pasa algo curioso en este momento y es que no sé qué agradecerle exactamente porque tengo que agradecerle absolutamente todo. Lo único que puedo decirle es algo que ya sabe, que en mí tiene un amigo. Respecto a mis compañeras de Labo Belén, Sonia, Noelia y Patri me ocurre lo que mencionaba antes. Ha habido cientos de momentos en los que he pensado, "bua, bua, ya veréis en los agradecimientos jeje (sonrisa maliciosa)". Y ahora, llegado el momento, quiero decirlas que gracias por tantísimos ratos geniales e incluso gracias por los ratos menos geniales, porque en ningún sitio está escrito que aprender sea un proceso que se realiza solo a base de risas, pero sí que es un proceso que para que se considere un éxito, debe ser algo que no se olvide. Y si algo tengo claro es que no voy a olvidar las cosas que he aprendido de todas ellas ☺.

Gracias a los "compas" del Depar con los que tantos ratos he compartido. Gracias al grupo "Nos Pegan" por las comidas de "caca" de los viernes, gracias por Galicia, y gracias por los parques de atracciones, gracias por los "juernes" en Argüelles y Malasaña. Gracias a Pablo, por los desayunos en la cafetería, hablando, muy enfrente, cada uno desde nuestro extremo (de la mesa). Gracias a los becarios de la U2, U3 y U5 por no haber dudado ni un momento en ayudar cuando ha hecho falta. Gracias a Merche por tantas y tantas conversaciones, por preguntar si todo va bien justo en el momento adecuado, por los *posits* con caritas sonrientes...

Y volviendo un poco atrás en el tiempo, gracias a los doctores Domingo Marquina y Antonio Santos, mis primeros "jefes" en el mundo científico. Entré por primera vez en su laboratorio a trabajar siendo un "niño", y ellos, a través de las levaduras killer, hicieron de mí algo, digamos, "menos niño", algo más acorde para trabajar en un laboratorio. De alguna manera, con ellos empezó todo lo que acabará conmigo obteniendo el grado de Doctor.

Saliendo un poco del mundo académico, pero no por ello menos importante, gracias a mis padres. Sin su constante apoyo incondicional en todos los aspectos, desde luego hoy no estaría escribiendo estas palabras. Ellos dirán que están orgullosos de mí por haber acabado la tesis, pero el verdadero orgullo es mío por tener unos padres como ellos. Gracias al abu (que no puede disfrutar de este momento pero que esté donde esté por fin verá que al final fue posible), a la yaya y a la abuela por tanto cariño, por estar siempre atentas a la evolución de la tesis, y por llevar meses ilusionadas "preparando" el *cátering* del día D. Gracias a los primos, a los que más que primos son amigos, por estar siempre apoyándome. Txabales, decíamos CAMBIEMOS, pero yo prefiero que no cambiemos nunca.

Gracias a Tomás, a Maru, a Noelia y a todo el "equipo de Callao" por haber sido una parte tan importante durante este periodo de mi vida, por su confianza, por su apoyo, por sus cuidados, y sobre todo gracias por ser el tipo de gente a la que me gustaría parecerme algún día. Gracias a Emilia, a Macu y a Pedro por cuidarme tanto, por haber seguido la evolución de esta tesis casi página a página, por los cafés, por los consejos y por estar siempre encima. Gracias también a Luís y a Inma por su confianza en muchísimas ocasiones.

No quiero olvidarme de la etapa final de la realización de este trabajo, por lo que por supuesto gracias a Fran y a Sonia, los dueños del Pub Jocker, por haber puesto todas las facilidades habidas y por haber para hacer compatible la escritura de una tesis doctoral con el trabajo en un ámbito absolutamente ajeno a la ciencia. Y es que si el Jocker no existiera alguien tendría que inventarlo. Gracias a mis amigos, especialmente a Fran, Irene, Mario, Jose y Diego, por haber sido, en diferentes etapas, parte de todo esto. Siempre he pensado que usamos la palabra Amistad muy a la ligera, pero con ellos no dudo en utilizarla con mayúscula. Y gracias a la txabalada más [Despierta] de Moratalaz por sus ánimos, por sus consejos, por los Sorias, por la montaña, y sobre todo e infinitamente más importante, gracias por la tranquilidad que da saber que ellos siempre están ahí. Sé que "incendiaremos el mundo otra vez".

Por último, gracias a mi balón de fútbol, porque durante la escritura de esta tesis, he pasado más tiempo despejándome pateándolo por el pasillo que sentado en el escritorio.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	17
1. LA PARED CELULAR EN LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.1 COMPONENTES DE LA PARED CELULAR de <i>S. cerevisiae</i>	20
1.1.1 Polisacáridos	20
1.1.2 Manoproteínas	22
1.1.3 Ensamblaje de los componentes de la pared celular	23
1.2 LA REGULACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN DE LA PARED CELULAR	24
2. LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE INTEGRIDAD CELULAR (CWI)	25
2.1 LOS SENSORES DE LA RUTA CWI	28
2.2 Rho1 Y Pkc1	31
2.3 EL MÓDULO DE MAP QUINASAS DE LA RUTA CWI	31
2.4 LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA RUTA CWI	32
3. LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA RUTA CWI EN CONDICIONES QUE COMPROMETEN LA INTEGRIDAD CELULAR	35
4. OTRAS RUTAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE LA PARED CELULAR	36
5. REGULACIÓN DEL CONTROL NUTRICIONAL EN <i>S. cerevisiae</i>	39
5.1 LA RUTA cAMP/PKA	40
5.1.1 El sistema de detección de glucosa GPCR	41
5.1.2 Las proteínas Ras	42
5.1.3 La proteína PKA	44
5.1.4 Las dianas de la proteína PKA	45
5.1.4.1 La proteín quinasa Rim15	46

5.1.4.2	Los factores de transcripción regulados por la proteína PKA	47
5.1.4.2.1	Msn2 y Msn4	47
5.1.4.2.2	Gis1 y Rph1	48
5.2	OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE NUTRIENTES RELACIONADAS CON PKA	50
	OBJETIVOS	55
	MATERIALES Y MÉTODOS	59
1.	MICROORGANISMOS UTILIZADOS	61
1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
1.2	<i>Escherichia coli</i>	62
2.	MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	62
2.1	MEDIOS DE CULTIVO DE <i>S. cerevisiae</i>	62
2.2	MEDIOS DE CULTIVO DE <i>E. coli</i>	63
2.3	CONDICIONES DE CULTIVO Y DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO	63
3.	MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	64
3.1	EXTRACCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE DNA	64
3.2	PLÁSMIDOS UTILIZADOS	65
3.3	TRANSFORMACIÓN BACTERIANA	66
3.4	TRANSFORMACIÓN EN LEVADURA	66
4.	ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE MICROARRAYS DE DNA	66
4.1	EXTRACCIÓN DEL RNA	67
4.2	SÍNTESIS, MARCAJE E HIBRIDACIÓN DEL cDNA	67
4.3	ANÁLISIS DE IMÁGENES, PROCESAMIENTO DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS	68
5.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA	68
6.	DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN-BLOT Y ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN	70
6.1	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	70

6.2 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	71
6.3 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA	71
6.4 INMUNODETECCIÓN	71
7. DETERMINACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL <i>RATIO</i> Ras2-GTP / Ras2 TOTAL	74
8. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	75
9. CUANTIFICACIÓN DEL AMP CÍCLICO INTRACELULAR	76
10. DETECCIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO INTRACELULAR	77
11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	77
12. MEDIDA DEL pH INTRACELULAR	78
RESULTADOS	81
1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL FRENTE A CASPOFUNGINA	83
2. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A CASPOFUNGINA	87
2.1 ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE Sit2 EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A CASPOFUNGINA	89
2.2 VALIDACIÓN DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA	91
2.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A CASPOFUNGINA INDEPENDIENTE DE Sit2 CON DATOS DE EXPRESIÓN A ESCALA GENÓMICA	92
3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA RUTA DE LA PROTEÍNA QUINASA A (PKA) EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A CASPOFUNGINA	95
3.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	95
3.2 ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE Msn2	98

4. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CASPOFUNGINA SOBRE LA REGULACIÓN DE PKA	100
4.1 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE PKA	100
4.1.1 Estudio de la fosforilación de Cki1	100
4.1.2 Estudio de la fosforilación de Pat1	101
4.1.3 Determinación de glucógeno intracelular	102
4.2 EFECTO DE LA CASPOFUNGINA SOBRE EL NIVEL DE AMP CÍCLICO INTRACELULAR Y SOBRE LA ACTIVACIÓN DE Ras2	104
5. EL TRATAMIENTO CON CASPOFUNGINA INDUCE UNA DISMINUCIÓN DEL pH INTRACELULAR	107
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXOS	151

RESUMEN

Regulación de la expresión génica en respuesta a inhibidores de β -1,3-glucán sintasa en *Saccharomyces cerevisiae*

Introducción

La pared celular fúngica es una envoltura rígida esencial para proteger a la célula de las condiciones ambientales adversas preservando la integridad celular. Esta estructura está constituida principalmente por polisacáridos y proteínas. Así, la pared celular se organiza en cadenas de β -1,3-glucano con ramificaciones de β -1,6-glucano formando una matriz a la que se une covalentemente la quitina y las manoproteínas. La ausencia de esta estructura en células eucariotas superiores hace de ella una diana potencial para agentes antifúngicos. Entre los compuestos utilizados en la actualidad en la terapia antifúngica se encuentra la caspofungina, cuyo mecanismo de acción es la inhibición del complejo β -1,3-glucan sintasa (GS). De esta forma, el tratamiento con este fármaco afecta a la síntesis de β -1,3-glucano, principal componente de la pared celular fúngica, y por tanto, a la integridad de la misma.

En *Saccharomyces cerevisiae*, diferentes situaciones de estrés sobre la pared celular conducen a una respuesta transcripcional relacionada con los cambios necesarios para la adaptación de la célula, garantizando así su supervivencia en condiciones adversas. Esta modificación del perfil transcripcional depende principalmente de la activación, a través de una serie de eventos de fosforilación, de la ruta de MAP quinasas de integridad celular (CWI). Así, en situaciones que comprometen la integridad de la pared celular, las proteínas de membrana Wsc1-3, Mid2 y Mtl1 actúan como sensores específicos de daño de esta ruta, interactuando con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) Rom2, que activa a la GTPasa Rho1. Rho1 a su vez activa la proteína quinasa C (Pkc1), que transmite la señal al módulo de MAP quinasas, constituido por Bck1, Mkk1/2 y Slt2, que se activan a través de un proceso de fosforilación secuencial. Una vez fosforilado, Slt2 activa a los factores de transcripción Rlm1 y Swi4/Swi6, responsables de la activación transcripcional de genes cuyos productos están implicados en la remodelación de la pared en respuesta al daño causado sobre la misma. Además, la respuesta adaptativa global incluye una serie de cambios en la pared tales como un incremento en la cantidad de manoproteínas y quitina, la modificación en las asociaciones que se producen entre los diferentes componentes de la pared y una redistribución del complejo GS.

El crecimiento celular y la disponibilidad de nutrientes en *S. cerevisiae* está coordinado por la ruta de señalización cAMP/PKA que controla la expresión de la mayor parte de los genes modulados por la disponibilidad de glucosa. La proteína PKA es un heterotetrámero constituido por dos subunidades catalíticas, codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* o *TPK3* y por dos subunidades reguladoras codificadas por *BCY1*. En ausencia de glucosa, las subunidades Bcy1 se unen las subunidades Tpk formando un complejo catalíticamente inactivo. Por el contrario, en presencia de glucosa se produce un incremento en los niveles de AMP cíclico (AMPc) intracelular, que se une a las subunidades Bcy1, permitiendo así la liberación y activación de las subunidades catalíticas. Los niveles intracelulares de AMPc son regulados por dos actividades opuestas. Una de síntesis catalizada por la enzima adenilato ciclasa (AC), estimulada por las GTPasas Ras1 y Ras2, y otra de degradación mediada por las fosfodiesterasas Pde1 y Pde2. Se ha propuesto que la disponibilidad de glucosa afecta a la actividad de las proteínas Ras a través de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), cuya actividad está modulada a su vez por el pH citosólico. De esta forma, en presencia de glucosa en el medio se produce un incremento del pH citosólico que conduce a la activación de la VATPasa, la cual, a través de la GTPasa Arf1, activa las proteínas Ras. Sin embargo, en condiciones de inhibición de la ruta cAMP/PKA se produce la activación de la proteína quinasa Rim15 y de los factores de transcripción Msn2/4, Gis1 y Rph1, asociados respectivamente a la expresión de genes vinculados con la respuesta a estrés, con la fase postdiáuxica y con la entrada en la fase estacionaria.

Objetivos y resultados

El objetivo fundamental de este trabajo fue la caracterización de la regulación de la respuesta transcripcional frente al inhibidor de la actividad β -1,3-glucán sintasa, caspofungina. Para ello, en primer lugar se obtuvieron los perfiles globales de expresión génica, empleando microarrays de DNA, tanto de una cepa silvestre como de las cepas mutantes *slt2 Δ* y *rlm1 Δ* crecidas en presencia o ausencia de este fármaco. La comparación de los perfiles transcripcionales obtenidos ha permitido determinar que de los 211 genes que se inducen en presencia de caspofungina en esta cepa, 72 lo hacen de forma dependiente de la MAP quinasa. El perfil transcripcional obtenido en el mutante *rlm1 Δ* fue similar al observado en la cepa *slt2 Δ* . Como era de esperar, dentro de este grupo de genes dependientes de Slit2 están incluidos muchos de los inducidos frente a

otras situaciones de estrés sobre la pared celular. De hecho, en esta parte de la respuesta se observa una elevada representación de genes asociados al mantenimiento de la integridad de la pared celular y a la transducción de señales. La activación de la ruta CWI en presencia de caspofungina se puso de manifiesto mediante el estudio de los niveles de fosforilación de Slt2 en distintas cepas mutantes delecionadas en elementos de la ruta, demostrándose la dependencia del sensor Wsc1, además de Rom2, Bck1 y Mkk1/2. Además, los mutantes del módulo de MAP quinasas de la ruta fueron hipersensibles a caspofungina, especialmente el mutante *slt2Δ*, demostrando la importancia funcional de la respuesta adaptativa dependiente de la ruta CWI en estas condiciones.

Los resultados del análisis bioinformático realizado sobre los 139 genes independientes de Slt2 muestran una elevada similitud con patrones de expresión obtenidos en condiciones de inhibición de la ruta cAMP/PKA. Este fenómeno es coherente con el hecho de que en esta parte de la respuesta existe una elevada representación de genes asociados a la respuesta a estrés, el metabolismo y la obtención de energía, funciones que exhibían una presencia reducida en el grupo de genes dependientes de Slt2. Este resultado, junto con la presencia de genes potencialmente regulados por los factores de transcripción Msn2/4 (en cuya regulación participa PKA) en esta parte de la respuesta, nos llevó a plantear el objetivo de caracterizar la implicación de la ruta cAMP/PKA en la respuesta a caspofungina. Para ello, en primer lugar se realizó un análisis transcripcional global en el doble mutante *msn2/4Δ*. El resultado de este análisis indicó que de los 211 genes que se inducen en presencia de caspofungina, 36 lo hacen de forma dependiente de Msn2/4, estando 29 de ellos incluidos en la respuesta independiente de Slt2 (21% del total de este grupo de 139 genes). Es destacable que un elevado número de genes no regulados por Slt2 ni por Msn2/4 presenten sitios STRE, motivo de unión al DNA de Msn2/4 y de Rph1, y sitios PDS, motivo de unión de Gis1. Este fenómeno, junto con el hecho de que estudios previos han determinado que un alto número de estos genes son regulados por Msn2/4, Rph1 y Gis1 de forma coordinada, sugiere que este mismo efecto tenga lugar como consecuencia de la exposición de la levadura a caspofungina. En todo caso, la observación de que el tratamiento con este antifúngico incrementa la localización nuclear de Msn2-GFP, como sucede en otras situaciones de inhibición de la ruta cAMP/ PKA, apoya la participación de este factor de transcripción en la regulación transcripcional observada. Además, en una cepa *bcy1Δ*, que muestra una activación constitutiva de PKA, este fenómeno se encuentra bloqueado, al igual que el proceso de acumulación intracelular de glucógeno (también asociado a la inhibición de PKA) que sí se

observa en la cepa silvestre en respuesta al fármaco. Por el contrario, en las cepas mutantes en los elementos de la ruta CWI ni la translocación nuclear de Msn2-GFP ni la acumulación de glucógeno se ven afectados, a excepción del mutante *wsc1Δ*, lo que sitúa a este sensor como responsable del efecto observado sobre las rutas CWI y cAMP/PKA en presencia de caspofungina.

Llevando a cabo diversas aproximaciones bioquímicas hemos podido establecer que el tratamiento con caspofungina da lugar a un fuerte descenso del nivel de Ras2-GTP, el descenso de los niveles de AMPc intracelular y la inhibición de la fosforilación de sustratos de PKA. Estos resultados han permitido proponer que a través de la señalización mediada por Wsc1, la caspofungina induce la inactivación de Ras2, lo que se traduce en un descenso en los niveles de AMPc intracelular al no producirse la activación de la AC. De esta forma, las subunidades catalíticas Bcy1 se mantienen unidas a las subunidades Tpk, manteniendo inhibida la actividad de PKA. Además, hemos demostrado que el efecto inhibitorio de PKA no se pone de manifiesto cuando se activa esta ruta de forma constitutiva, como sucede en el caso de la cepa mutante carente de las fosfodiesterasas Pde1 y Pde2. El hecho de que esta cepa muestre hipersensibilidad frente a caspofungina sugiere que la inhibición de PKA sea beneficiosa para el crecimiento de la levadura en presencia del fármaco. Cabe destacar que tanto la dinámica temporal de inhibición de la actividad de PKA como la de la translocación nuclear de Msn2, alcanzando ambos fenómenos un pico máximo tras aproximadamente 2 horas de exposición a caspofungina, es diferente de la que se produce frente a otros estímulos, donde el efecto tiene lugar a tiempos más cortos, pero similar al de la activación de la ruta CWI frente a diversos daños sobre la pared celular. Este dato es coherente con el hecho de que la inhibición de PKA dependa de Wsc1.

Por último, con el fin de analizar si la inhibición de Ras2 inducida por caspofungina se podía asociar a variaciones en el pH citosólico, procedimos a medir el pH utilizando una variante de la proteína verde fluorescente sensible a pH, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *wsc1Δ* tratados o no con caspofungina. Se pudo constatar que la caspofungina produce un significativo descenso del pH citosólico en la cepa silvestre, mientras que en la cepa carente del sensor no se produjo variación alguna. Además, utilizando las versiones quiméricas de los principales sensores de la ruta CWI, Wsc1 y Mid2, incluyendo la región extracitoplásmica de Mid2 fusionada a la citoplasmática de Wsc1 y viceversa, se comprobó que la región extracitoplásmica de Wsc1 es esencial para que tenga lugar el efecto sobre el pH causado por la caspofungina. A partir

de estos resultados es posible hipotetizar que el efecto sobre la actividad de Ras2, y por tanto de PKA, se produzca a través de la variación del pH citosólico en un proceso señalizado por la región extracitoplásmica del sensor Wsc1.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que las alteraciones en la red de β -1,3 glucano de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* mediadas por caspofungina inducen la expresión de 211 genes, asociados fundamentalmente a la respuesta a estrés, transporte, metabolismo, transducción de señales y mantenimiento de la integridad de la pared celular. Esta respuesta transcripcional, que se encuentra bloqueada completamente en una cepa carente del sensor Wsc1, incluye a su vez un grupo de genes Slt2 dependientes (34,1%) y otro de genes Slt2 independientes (65,9%). La inducción del primer grupo de genes está mediada por la ruta CWI a través del sensor Wsc1, de la GEF de Rho1 Rom2, de los elementos del módulo de MAP quinasas (Mkk1/2, Bck1 y Slt2) y del factor de transcripción Rlm1. La inducción del grupo de genes independientes de Slt2 está asociada a una inhibición de la ruta cAMP/PKA. Se ha podido comprobar que la ausencia de los factores de transcripción Msn2/4, cuya activación está asociada a la inhibición de PKA, afecta a los niveles de expresión de un 21% del grupo de genes Slt2 independientes, apoyando la idea de que otros factores regulados por PKA participan de forma coordinada en la respuesta transcripcional.

La inhibición de la actividad de PKA causada por el tratamiento con caspofungina está mediada por un descenso significativo de los niveles de AMPc intracelular, como consecuencia de la inactivación de Ras2. Además, este fármaco induce una disminución del pH citosólico, fenómeno que podría estar asociado a la inactivación de Ras2, de forma dependiente de la región extracitoplásmica del sensor Wsc1. Por tanto, esta región es la responsable de detectar el daño causado por la caspofungina conduciendo a la correspondiente activación de la ruta CWI y la inhibición de la ruta cAMP/PKA.

SUMMARY

Regulation of gene expression in response to inhibitors of β -1,3-glucan synthase in *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

The fungal cell wall is a rigid envelope essential to protect the cell from adverse environmental conditions while preserving cell integrity. This structure mainly consists of polysaccharides and proteins. Thus, the cell wall is organized into β -1,3-glucan chains with β -1,6-glucan branches forming a matrix to which chitin and mannoproteins are covalently bound. The absence of cell wall in higher eukaryotic cells makes this structure a potential target for antifungal agents. Among the compounds having antifungal activity used in the clinic, caspofungin inhibits the β -1,3-glucan synthase (GS) complex. Accordingly, treatments employing this drug affect the synthesis of β -1,3-glucan, main component of the fungal cell wall, and therefore, its integrity.

In *Saccharomyces cerevisiae*, different stress conditions against the cell wall lead to a transcriptional response which is necessary for a cell to adapt, and survive under adverse conditions. This modification of the transcriptional profile depends primarily on the activation, through successive phosphorylation events, of the MAP kinase Cell Wall Integrity (CWI) pathway. Thus, in situations that compromise the integrity of the cell wall, the cell surface proteins Wsc1-3, Mid2 and Mtl1 act as specific damage sensors of the CWI pathway, interacting with the Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) Rom2, which activates the GTPase Rho1. Rho1 in turn activates the protein kinase C (Pkc1), which transmits the signal to the MAP kinase module, consisting of Bck1, Mkk1/2 and Slk2, which are activated through a sequential phosphorylation process. Once phosphorylated, Slk2 activates the transcription factors Rlm1 and Swi4/Swi6, responsible for the transcriptional activation of genes whose products are involved in the cellular wall remodeling. Moreover, the global adaptive response includes a series of wall changes encompassing the increase in the amount of mannoproteins and chitin, the modification of the crosslinking between different cell wall components, and a GS complex redistribution.

Cell growth and nutrient availability in *S. cerevisiae* is coordinated by the cAMP/PKA signaling pathway that controls the expression of most of the genes modulated by glucose availability. The PKA protein is a heterotetramer consisting of two catalytic subunits, encoded by the *TPK1*, *TPK2* or *TPK3* genes and by two

regulatory subunits encoded by *BCY1*. In the absence of glucose, the Bcy1 subunits bind the Tpk subunits forming a catalytically inactive complex. Conversely, in the presence of glucose there is an increase in the levels of intracellular cyclic AMP (cAMP), which binds to the Bcy1 subunits, thus allowing the release and activation of the catalytic subunits of PKA. cAMP intracellular levels are regulated by two opposite activities. A synthetic activity that is catalyzed by the adenylate cyclase (AC) enzyme and stimulated by Ras1 and Ras2 GTPases, and a degradation activity mediated by the Pde1 and Pde2 phosphodiesterases. It has been proposed that the availability of glucose affects Ras proteins activity through the vacuolar ATPase (V-ATPase), whose activity is modulated by the cytosolic pH. Thus, in the presence of glucose in the medium, an increase in cytosolic pH occurs leading to V-ATPase activation, which eventually activates Ras through the Arf1 GTPase. However, under conditions of inhibition of the cAMP/PKA pathway occurs the activation of the protein kinase Rim15 and the Msn2/4, Gis1 and Rph1 transcription factors associated with the expression of genes related to the stress response, the post-diauxic phase and stationary phase, respectively.

Objectives and Results

The main objective of this work was to characterize the regulation of the transcriptional response against caspofungin, an inhibitor of β -1,3-glucan synthase activity. In order to achieve this, we first obtained global gene expression profiles, using DNA microarrays, from a wild-type strain and from the mutant strains *slt2 Δ* and *rlm1 Δ* grown in the presence or absence of this drug. The comparison between the resulting transcriptional profiles has allowed to determine that 72 out of 211 induced genes in presence of caspofungin are not up-regulated in the MAP kinase mutant *slt2 Δ* . The transcriptional profile obtained in the *rlm1 Δ* mutant was similar to the one observed in *slt2 Δ* . As expected, within this group of Slit2-dependent genes are included many of the induced ones under other stress situations on the cell wall. In fact, in this part of the response there is a high representation of genes associated with the maintenance of cell wall integrity and signal transduction. Activation of the CWI pathway in the presence of caspofungin was demonstrated by studying the levels of phosphorylation of Slit2 in different mutant strains deleted in elements of the pathway, observing the dependence on the Wsc1 sensor, in addition to Rom2, Bck1 and Mkk1/2. Moreover, mutants of the MAP kinase module of the pathway were hypersensitive

to caspofungin, especially the mutant *slt2Δ*, demonstrating the functional importance of the adaptive response elicited through the CWI pathway.

The results from the bioinformatic analysis performed on the 139 Slt2-independent genes show a high similarity with expression patterns obtained under conditions of inhibition of the cAMP/PKA pathway. This phenomenon is consistent with the fact that in this part of the response there is a high representation of genes associated with stress response, metabolism and energy, functions underrepresented within the Slt2-dependent group. This result, together with the presence of genes potentially regulated by the transcription factors Msn2/4 (in whose regulation PKA participates), led us to raise the objective of characterizing the involvement of the cAMP/PKA pathway in the response to caspofungin. Because of this, a global transcriptional analysis was carried out in the double mutant *msn2/4Δ*. The result of this analysis indicated that of the 211 genes that are induced in the presence of caspofungin, 36 were dependent on Msn2/4, with 29 of them included in the Slt2-independent response (21% of the total of 139 genes included in this group). It is noteworthy that a high number of genes not regulated by Slt2 or by Msn2/4 present STRE sites (Msn2/4 and Rph1 DNA binding motifs) and PDS sites (Gis1 binding motif). Previous studies have determined that a high number of these genes are regulated by Msn2/4, Rph1 and Gis1 in a coordinated pattern; therefore, this phenomenon suggests that same effect occurs as a consequence of the exposure of yeast to caspofungin. In any case the observation that treatment with this antifungal drug increases the nuclear localization of Msn2-GFP, as reported for other conditions of inhibition of the cAMP/PKA pathway, supports the participation of this transcription factor in the regulation of gene expression observed. Furthermore, in a strain *bcy1Δ*, which shows a constitutive activation of PKA, this phenomenon is blocked, in addition to the process of intracellular accumulation of glycogen (also associated with PKA inhibition) that is observed in the wild-type strain in response to the drug. In contrast, in mutant strains in the elements of the CWI pathway the nuclear translocation of Msn2-GFP and the accumulation of glycogen are not affected, except for the *wsc1Δ* mutant. This demonstrates that this sensor is responsible for the observed effect on the CWI and cAMP/PKA pathways in the presence of caspofungin.

We have been able to establish, following diverse biochemical approaches, that treatment with caspofungin leads to a sharp decrease in the level of Ras2-GTP, a decrease in intracellular cAMP levels and the inhibition of phosphorylation of PKA substrates. These results have allowed us to propose that through the

signaling mediated by Wsc1, caspofungin induces the inactivation of Ras2, which results in a decrease in intracellular cAMP levels. Thus, the Bcy1 catalytic subunits remain bound to the Tpk subunits, keeping the activity of PKA inhibited. In addition, we have shown that the inhibitory effect of PKA is not evident when this pathway is activated constitutively, as in the case of the mutant strain lacking the phosphodiesterases Pde1 and Pde2. The fact that this strain shows hypersensitivity to caspofungin suggests that the inhibition of PKA is beneficial for the growth of yeast in the presence of the drug. It should be noted that both the temporal dynamics of inhibition of PKA activity and nuclear translocation of Msn2, reaching a maximum peak after approximately 2 hours of exposure to caspofungin, are different from that observed with other stimuli, where the effect is detected at shorter times, but similar to the activation of the CWI pathway under cell wall damage conditions. These results are in agreement with the key role of Wsc1 in the PKA inhibition.

Finally, in order to assess whether the inhibition of Ras2 induced by caspofungin could be associated with variations in the cytosolic pH, we proceeded to measure the pH using a variant of the green fluorescent protein sensitive to pH, both in the wild-type strain and in the *wsc1Δ* mutant treated or not with caspofungin. It was found that caspofungin produces a significant decrease in cytosolic pH in the wild-type strain, while in the strain lacking the sensor, no variation occurred. In addition, using chimeric versions of the main sensors of the CWI pathway, Wsc1 and Mid2, including the extracytoplasmic region of Mid2 fused to the cytoplasmic of Wsc1 and conversely, it was proved that the extracytoplasmic region of Wsc1 is essential for the pH variation. From these results it is possible to hypothesize that the effect on the activity of Ras2, and eventually on PKA, occurs through the variation of the cytosolic pH in a process signalized by the extracytoplasmic region of the Wsc1 sensor.

Conclusions

The results from the present work showed that alterations in the β -1,3 glucan network of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* mediated by caspofungin induce the expression of 211 genes, mainly associated with the response to stress, transport, metabolism, signal transduction and maintenance of cell wall integrity. This transcriptional response, which is completely blocked in a strain lacking the Wsc1 sensor, includes a group of Slt2-dependent (34.1%) and another group of Slt2-independent genes (65.9%). The induction of the first group

of genes is mediated by the CWI pathway through the Wsc1 sensor, the GEF of Rho1 Rom2, the MAP kinase module elements (Mkk1/2, Bck1 and Slt2) and the transcription factor Rlm1. The induction of the group of Slt2-independent genes is associated with an inhibition of the cAMP/PKA pathway. It was found that the absence of the transcription factors Msn2/4, whose activation is associated with the inhibition of PKA, affects the expression levels of 21% of the group of Slt2-independent genes, supporting the idea that other factors regulated by PKA participate in a coordinated pattern in the transcriptional response.

The inhibition of PKA activity caused by treatment with caspofungin is mediated by a significant decrease in intracellular cAMP levels, as a consequence of the inactivation of Ras2. In addition, this drug induces a decrease in cytosolic pH, a phenomenon that could be associated with the inactivation of Ras2, dependent on the extracytoplasmic region of the Wsc1 sensor. Therefore, this region is responsible for detecting the damage caused by caspofungin leading to the corresponding activation of the CWI pathway and the inhibition of the cAMP/PKA pathway.

INTRODUCCIÓN

1. LA PARED CELULAR DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

El término levadura hace referencia a una gran variedad de hongos, tanto ascomicetos como basidiomicetos microscópicos, cuya forma de vida es predominantemente unicelular. Incluye una gran cantidad de especies tanto patógenas como inocuas, muchas de las cuales están relacionadas con la industria alimentaria y con la investigación básica, entre las que se encuentra *Saccharomyces cerevisiae*. Las células de este microorganismo presentan todas las características fundamentales de las células eucariotas superiores, tales como núcleo diferenciado y separado del citoplasma por una membrana nuclear, orgánulos citoplasmáticos y un citoesqueleto organizado. Su facilidad de crecimiento y manejo en el laboratorio, su ausencia de patogenicidad y el hecho de que el ciclo vital de *S. cerevisiae* incluya una fase sexual que permite abordar estudios con las herramientas que provee la genética clásica, convierten a esta levadura en un modelo biológico eucariota en investigación básica. Además, el hecho de que el genoma de esta levadura haya sido completamente secuenciado (Goffeau *et al*, 1996), supone una importante ventaja en el análisis genético y molecular de este organismo.

En *S. cerevisiae* la pared celular es una estructura esencial de la célula para garantizar la viabilidad de la misma en las diferentes condiciones medioambientales. Esta estructura es una envoltura rígida localizada en la cara externa de la membrana plasmática que delimita por tanto la célula de su medio externo. También está presente en bacterias, en otras levaduras, en hongos superiores y en células vegetales. Una de sus funciones más importantes es evitar la lisis celular consecuencia de la presión osmótica superior existente en el interior celular respecto al medio externo (Svoboda, 1981; Valdivia & Schekman, 2003). El anclaje de glicoproteínas a la pared celular es necesario para el proceso de biogénesis y remodelación de la misma en respuesta a modificaciones de las condiciones ambientales, limitar la permeabilidad de esta estructura a macromoléculas (de Nobel *et al*, 1990; Zlotnik *et al*, 1984) y, junto con la presencia de grupos fosfato cargados negativamente, evitar la salida de agua de la célula. La aparente rigidez de esta estructura no implica que sea estática. Es, por el contrario, muy dinámica, estando sujeta a cambios y remodelaciones que se producen a lo largo del ciclo vital de la célula como son la división celular, el crecimiento pseudohifal o el proceso de esporulación (Cid

et al, 1995; Kapteyn *et al*, 1999) o en respuesta a variaciones en el medio ambiente (Levin, 2005; 2011).

Además, el hecho de que la pared celular sea un componente ausente en células eucariotas superiores convierte a esta estructura en una diana ideal para la identificación y desarrollo de agentes antifúngicos.

1.1 COMPONENTES DE LA PARED CELULAR DE *S. cerevisiae*

La pared celular de *S. cerevisiae* constituye entre el 15 y el 30% del peso seco del total de la célula y presenta un grosor comprendido entre 110 y 200 μm (Aguilar-Uscanga & François, 2003; Dupres *et al*, 2009). Está constituida por polisacáridos (85%) y proteínas (15%). La fracción correspondiente a los polisacáridos está formada fundamentalmente por glucosa (80-90%) y constituye la capa interna de la pared (Zlotnik *et al*, 1984). Esta se organiza en una red de polímeros lineales de glucano unidos entre sí mediante enlaces β -1,3-glucosídicos y es responsable, junto con la quitina, de la rigidez y la integridad de la pared celular (Cid *et al*, 1995; Rho *et al*, 2002). De estas cadenas lineales surgen ramificaciones de β -1,6-glucano unidas mediante enlaces aún no caracterizados. Estas ramificaciones presentan menor tamaño en cuanto al número de monómeros de glucosa que lo componen respecto al β -1,3-glucano. Así, el β -1,6-glucano ensambla las cadenas de β -1,3-glucano, originando una estructura amorfa que aporta flexibilidad a la pared (Cabib, 2009). Esta red constituida por β -1,3 y β -1,6-glucano se encuentra unida a quitina, polímero de N-acetilglucosamina, que constituye un 1-2% del total de polisacáridos, mediante enlaces β -1,4-glucosídicos (Kapteyn *et al*, 1997; Kollar *et al*, 1995). Además, residuos de manosa se unen a la fracción protéica de la pared celular, constituyendo manoproteínas que a su vez se encuentran unidas al β -1,3 y β -1,6-glucano, formando la capa más externa de la pared celular (Kollar *et al*, 1997; Lesage & Bussey, 2006).

1.1.1 Polisacáridos

La biosíntesis del β -1,3-glucano depende del complejo enzimático β 1,3-glucan sintasa. Este complejo se localiza en la membrana plasmática y consta de dos subunidades catalíticas, Fks1 (subunidad principal) y Fks2/Gsc2 (subunidad alternativa), y una subunidad reguladora, Rho1. El sustrato para la biosíntesis del β -1,3-glucano es la UDP-glucosa citoplásmática, que es incorporada a las

cadenas lineales ya sintetizadas mediante enlaces β -1,3 (Orlean, 1997). Rho1, la subunidad reguladora del complejo β -1,3-glucán sintasa, es una GTPasa que se encuentra asociada a la membrana plasmática a través de un grupo isoprenilo localizado en su extremo N-terminal (Inoue *et al*, 1999). Además, está involucrado en la organización del citoesqueleto de actina, por lo que participa en la morfogénesis celular (Rho *et al*, 2002) y forma parte de la ruta de transducción de señales que regula el mantenimiento de la integridad celular activando la proteína quinasa C (Pkc1).

La biosíntesis del β -1,6-glucano parece producirse también en la superficie celular, pero requiere de pasos previos en el citosol con la participación de proteínas secretoras del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático (Kollar *et al*, 1997; Shahinian & Bussey, 2000; Orlean, 2012; Cabib & Arroyo, 2013).

La quitina es un polímero lineal organizado en cadenas de 120-170 residuos de N-acetilglucosamina unidos entre sí por enlaces β -1,4 (Cabib *et al*, 1983). Estas cadenas se organizan a su vez formando microfibrillas estabilizadas mediante puentes de hidrógeno y localizadas en la zona de la pared próxima a la membrana plasmática, confiriendo así resistencia frente a la tracción a la pared celular (Smits *et al*, 2001) (Figura 1). Como se mencionaba anteriormente la mayor parte de la quitina presente en la pared celular se encuentra asociada a la fracción de glucanos. La fracción de quitina asociada a β -1,3-glucano, que corresponde al 40-45% del total, se encuentra localizada fundamentalmente en el cuello celular, mientras que la fracción asociada a β -1,6-glucano, correspondiente al 15-20% de la quitina total presente en la célula, está ubicada en su mayoría en la pared lateral. La quitina restante se encuentra libre en la pared (Cabib & Duran, 2005; Orlean, 2012).

La síntesis de quitina se encuentra regulada tanto a nivel de localización subcelular como a nivel de ciclo celular. Durante la gemación de una nueva yema se genera un anillo de quitina que culmina con la formación del denominado septo primario. A través de las membranas plasmáticas de las dos células se secretan los componentes restantes de la pared (glucanos y manoproteínas) que se depositan sobre la quitina y constituyen el septo secundario. (Kuranda & Robins, 1991; Baladron *et al*, 2002; Bi & Park, 2012). Las enzimas responsables de la síntesis de quitina son las quitin sintasas. Estas enzimas utilizan UDP-N-acetilglucosamina localizado tanto en la membrana plasmática como en unas vesículas denominadas quitosomas. En *S. cerevisiae* existen 3 quitin sintasas, CSI, CSII y CSIII, codificadas por los genes *CHS1*, *CHS2*, y *CHS3*

respectivamente (Valdivieso *et al*, 1991; Cabib *et al*, 2001). La quitin sintasa I actúa principalmente en la primera etapa del ciclo celular G1. Se localiza en la membrana plasmática y en los quitosomas (Kuranda & Robins, 1991; Cabib *et al*, 1992). La quitin sintasa II está implicada en la síntesis de la quitina del septo primario durante el proceso de división celular. (Rho *et al*, 2002; Roncero, 2002). La quitin sintasa III es responsable de la síntesis del 90-95% de la quitina presente en la pared celular (Chuang & Schekman, 1996; Ziman *et al*, 1996; Reyes *et al*, 2007). Está también implicada en la síntesis del quitosán de las ascosporas, un derivado desacetilado de la quitina (Shaw *et al*, 1991; Neiman, 2005).

1.1.2 Manoproteínas

Constituyen entre el 35 y el 50% del peso seco de la pared celular y están dispuestas en la capa más externa de la misma. Son polipéptidos unidos a hidratos de carbono dispuestos alrededor de toda la superficie celular constituyendo una estructura fibrilar, confiriendo por un lado porosidad a la pared y por otro actuando como barrera frente a enzimas líticas externas (Zlotnik *et al*, 1984). Tras su síntesis en el retículo endoplasmático son transportadas a través del aparato de Golgi hasta la membrana plasmática, desde donde se incorporan a la pared celular mediante enlaces de N- u O-glicosídicos (Kapteyn *et al*, 1997; Orlan *et al*, 2012). Destacan dos grandes tipos de manoproteínas unidas a la pared celular: las proteínas con repeticiones internas PIR (*Proteins with Internal Repeats*) y las proteínas de anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol).

Las proteínas PIR se unen a la pared celular mediante enlaces glicosídicos entre las manosas de sus cadenas O-glicosiladas y el β -1,3-glucano (Klis *et al*, 2002) y mediante enlaces ester entre el grupo carboxilo de un residuo de ácido glutámico de estas proteínas y el grupo hidroxilo de una glucosa del β -1,3-glucano, ejerciendo así un papel estabilizador sobre la pared (Yin *et al*, 2005; Ecker *et al*, 2006). Las proteínas GPI se unen al β -1,6-glucano a través de una molécula de glicosilfosfatidilinositol localizada en el dominio hidrofóbico presente en la región C-terminal y que facilita su anclaje a la pared (Kollar *et al*, 1997; Ecker *et al*, 2006). Sin embargo algunas proteínas GPI, como Cwp1, pueden unirse directamente al β -1,3-glucano (Kapteyn *et al*, 2001). Entre las funciones de las proteínas GPI destaca el papel estructural de algunas de ellas (Teparic *et al*, 2004), la actividad enzimática de otras (Mouyna *et al*, 2000; Carotti *et al*,

2004), la adhesión celular y la formación de biofilms, como es el caso de ciertas floculinas y adhesinas (Verstrepen *et al*, 2003; Lipke & Kurjan, 1992).

1.1.3 Ensamblaje de los componentes de la pared celular

Una vez sintetizados los componentes anteriormente descritos se produce su ensamblaje (Figura 1).

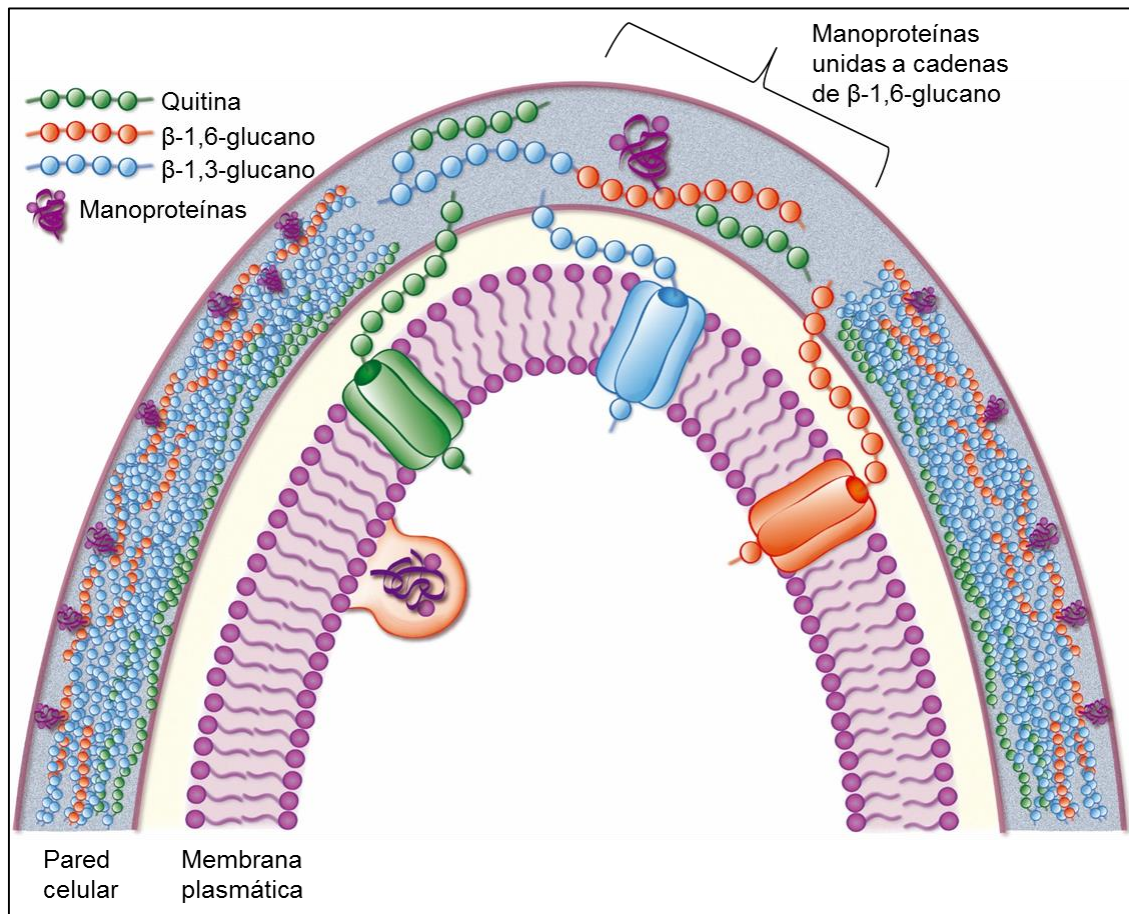


FIGURA 1. Representación esquemática de la estructura de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Cabib & Arroyo, 2013).

Así, una vez sintetizadas las cadenas de β -1,3-glucano a partir de UDP-glucosa, en un proceso catalizado por la enzima β -1,3-glucán sintasa (GS), la posterior extensión, elongación y reordenamiento de las cadenas de β -1,3 glucano es llevado a cabo por transglicosilasas de la familia Gas, siendo Gas1 la principal de ellas (Hartland *et al*, 1996; Mouyna *et al*, 2000; Carotti *et al*, 2004; Mazan *et al*, 2013). Estas enzimas transfieren el extremo reductor recién generado al extremo no reductor de la siguiente molécula β -1,3-glucano. Sobre estas cadenas recién sintetizadas se incorporan ramificaciones de β -1,6-glucano. A

continuación las manoproteínas se transfieren a las ramificaciones de β -1,6-glucano a través de los anclajes GPI (Roh *et al*, 2002; Ferguson *et al*, 2009). Finalmente se produce el ensamblaje entre la quitina, sintetizada a partir de UDP-N-acetilglucosamina por la enzima quitín sintasa III, y el β -1,3 y β -1,6-glucano. Este proceso es llevado a cabo por las proteínas de la familia Crh, Crh1 y Crh2. Estas dos enzimas, parcialmente redundantes y con actividad transglicosilasa, son las responsables de la formación de los enlaces covalentes que se producen entre la quitina y el β -1,3 y β -1,6-glucano (Rodríguez-Peña *et al*, 2000; Cabib *et al*, 2007; Cabib *et al*, 2009).

1.2 LA REGULACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN DE LA PARED CELULAR

La síntesis y la remodelación de la pared celular depende básicamente del ciclo celular, de procesos de polaridad y de sistemas de secreción. La expresión de los genes relacionados con la construcción de la pared celular está regulada por los factores de transcripción de la ruta de MAP quinasas de integridad celular (CWI) Swi4 y Swi6, que forman el complejo SBF (Iyer *et al*, 2001). La proteína-quinasa Cdc28, que es el elemento clave en la regulación del ciclo celular, participa en la regulación del complejo SBF, previa unión de la ciclina Cln3 que se une en la fase G1 del ciclo y activa la quinasa, activándose así la expresión de genes implicados en la biogénesis de la pared (Wittemberg & Reed, 2005; Spellman *et al*, 1998). Además, a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular, se modula la expresión de diversos genes relacionados con la construcción de la pared según las necesidades de la célula (Lesage & Bussey, 2006).

La participación del citoesqueleto es fundamental a lo largo del ciclo celular, puesto que da soporte a los cambios que se producen en la pared y permite el transporte de los componentes y enzimas necesarias para la construcción de la misma a través de vesículas de secreción. En la fase G1, la GTPasa Cdc42 y su efector, la serín treonín quinasa Cla4, son esenciales en el proceso de reclutamiento de actina en el sitio de gemación y la organización de los filamentos de actina alrededor del cuello entre las células madre e hija (Merlini & Piatti, 2011). Para la perfecta coordinación de los cambios en el citoesqueleto con las etapas del ciclo celular es necesaria la interacción entre Cdc28 unida a ciclinas y Cdc42 (Versele & Thorner, 2004). El citoesqueleto también es fundamental en la formación de vesículas de secreción que transportan componentes necesarios para la construcción de la pared celular. Para ello Cdc42 se une a Rho3 para activar los mecanismos de secreción post-Golgi y a

la GTPasa Rho1, promoviendo la polarización de la maquinaria de secreción. Diferentes GAPs (proteínas activadoras de GTPasas) y GEFs (factores intercambiadores de GTP) de Rho1 regulan su activación y por lo tanto su acción efectora sobre sus sustratos, fundamentalmente Pkc1, componente clave de la ruta de integridad celular (CWI) (Adamo *et al*, 2001; Guo *et al*, 2003). De esta forma mutantes delecionados de elementos reguladores de la polaridad celular presentan defectos en la construcción de la pared (Lesage *et al*, 2005).

2. LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE INTEGRIDAD CELULAR (CWI)

La integridad de la pared celular es requisito fundamental para la supervivencia celular. De esta forma, existen mecanismos de control de la homeostasis de esta estructura en condiciones fisiológicas que permiten a la levadura adaptarse a los diferentes eventos morfogénicos del ciclo biológico de la levadura. De igual forma existen mecanismos que permiten a la levadura adaptarse a diferentes situaciones cambiantes en el medio externo y diferentes tipos de agresiones que puedan afectar a su funcionalidad, tales como cambios de temperatura, pH, presión osmótica, etc.

La levadura es capaz de detectar y actuar adecuadamente frente a cambios en las condiciones ambientales de crecimiento o la presencia de diferentes estímulos, para lo cual utiliza complejas rutas de señalización de rápida respuesta que le permiten adaptarse y sobrevivir ante las nuevas situaciones. La mayoría de estas respuestas están reguladas a través de rutas de transducción de señales mediadas por MAP (*Mitogen-activated protein*; proteínas activadas por mitógenos) quinasas. Las rutas de MAP quinasas en *S. cerevisiae* se caracterizan por presentar un módulo de quinasas (constituido por una MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK), una MAP quiansa quinasa (MAPKK) y una MAP quinasa (MAPK) que se van activando de forma secuencial mediante eventos de fosforilación. La activación final de la MAPK induce la activación de los factores de transcripción específicos de cada ruta (Chen & Thorner, 2007). Las cinco rutas de MAP quinasas que existen en *S. cerevisiae* son la ruta de apareamiento, la ruta de filamentación, la ruta HOG (*High Osmolarity Glicerol*: alta osmolaridad de glicerol), la ruta de integridad celular (CWI) y la ruta de esporulación (Figura 2). Las MAP quinasas de las rutas de filamentación y apareamiento, ambas muy relacionadas entre sí por compartir elementos comunes, son Kss1 y Fus3 respectivamente. La MAP quinasa de la ruta HOG es

Hog1, encargada de activar la transcripción de diversos tipos de genes responsables de la respuesta adaptativa frente a un aumento de la osmolaridad del medio externo (Hohmann *et al*, 2009). Smk1 es la MAP quinasa de la ruta de esporulación, y se activa cuando las células diploides de *S. cerevisiae* crecen en medio pobre en nitrógeno y carente de una fuente de carbono fermentable (Qi & Elion, 2005). Por último, la MAP quinasa de la ruta de integridad celular es Slt2, responsable de regular los mecanismos relacionados con la integridad de la pared (Levin, 2011).

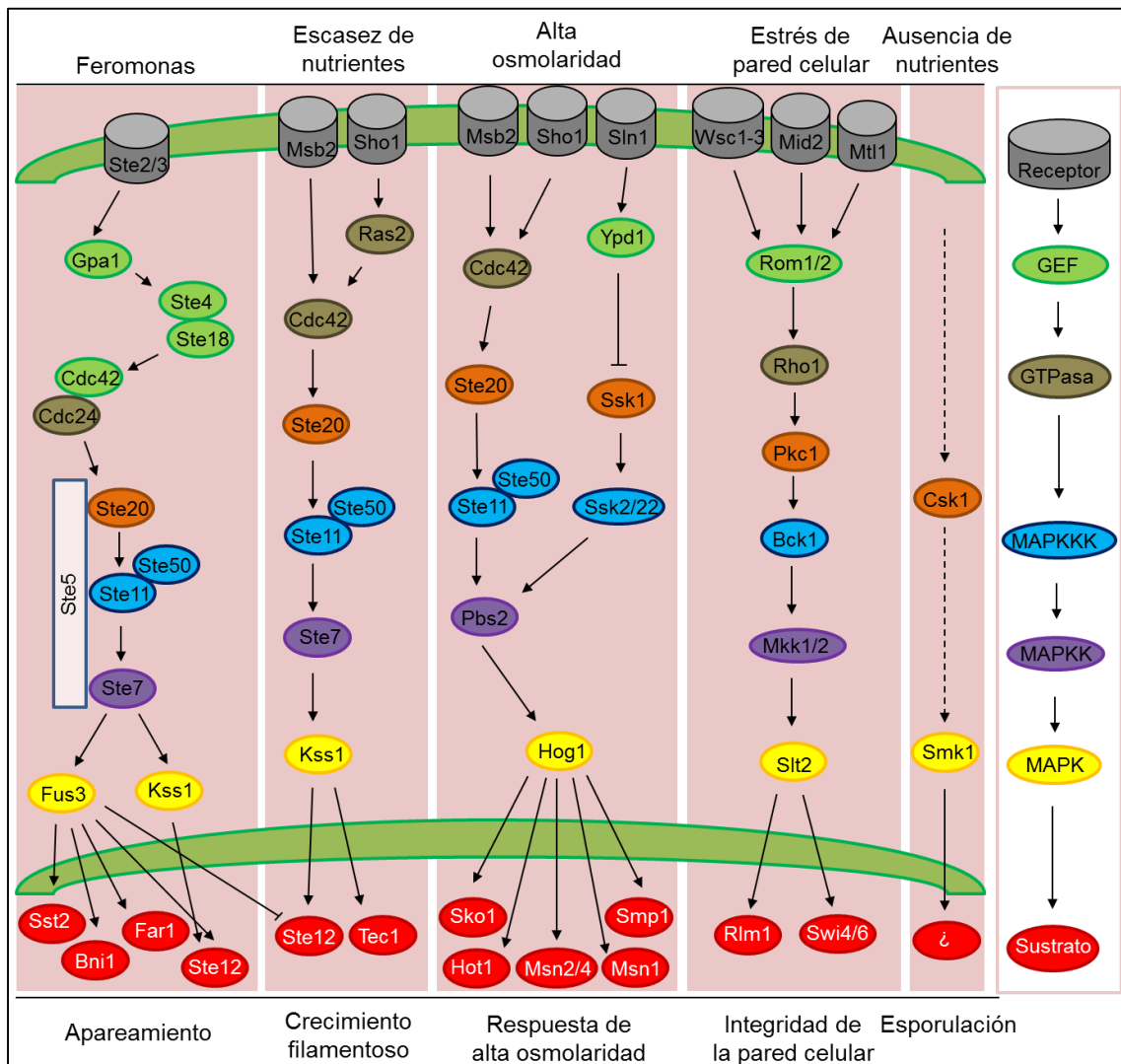


FIGURA 2. Esquema de las rutas de MAP quinasa en *Saccharomyces cerevisiae*.

La especificidad de respuesta está regulada por elementos específicos por encima de la ruta que actúan como receptores u osmosensores que conducen la señal debida a un estrés específico hacia el módulo de quinasa.

En el caso concreto de la ruta CWI, esta es la principal ruta responsable del mantenimiento de la integridad celular, e incluye una serie de sensores transmembrana que detectan las alteraciones causadas en la pared a causa de diferentes tipos de daño y transmiten la señal a la GEF de Rho1, Rom2. Así, esta GEF activa la GTPasa Rho1 que a su vez activa a la proteína quinasa C Pkc1. Pkc1 transmite la señal, mediante fosforilación, a la MAPKKK Bck1, que fosforila a las MAPKKs Mkk1 y Mkk2, las cuales a su vez activan mediante fosforilación a la MAPK de la ruta CWI, Slt2. Slt2 activa a los factores de transcripción Rlm1 y Swi4/Swi6, responsables de la activación de genes cuyos productos están implicados en la remodelación de la pared (Levin, 2005; 2011) (Figura 3).

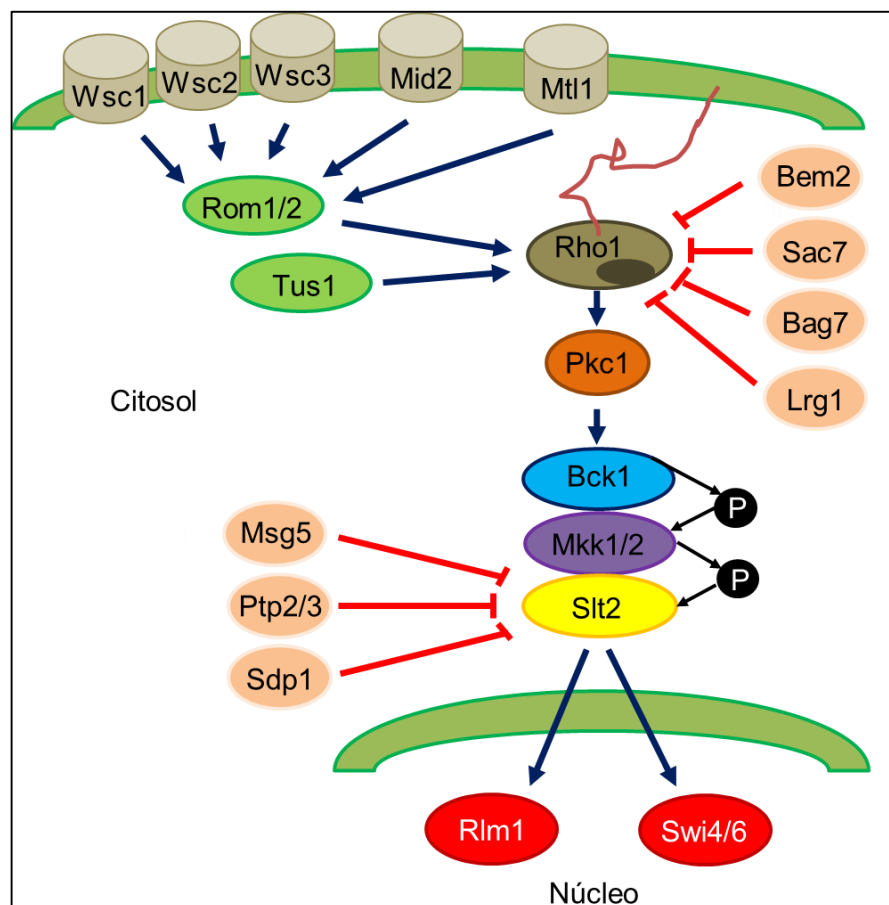


FIGURA 3. Esquema de la ruta de integridad celular (CWI) en *Saccharomyces cerevisiae*.

A continuación se describen los elementos más destacados de esta ruta.

2.1 LOS SENSORES DE LA RUTA CWI

Las alteraciones o variaciones en el medio externo que afectan a la estructura de la pared celular son detectadas por unas proteínas de la membrana plasmática que actúan como sensores de la ruta (Figura 4). Estos sensores son proteínas transmembrana tipo I y todos ellos presentan una estructura similar. Constan de un dominio C-terminal citoplasmático, un único dominio transmembrana y un dominio N-terminal extracitoplásmico rico en residuos de serina y treonina, y altamente O-manosilado (Jendretzky *et al*, 2011). Los sensores asociados a la ruta CWI se dividen en dos grupos: los sensores Wsc1, Wsc2 y Wsc3, de la familia Wsc (*Cell Wall Integrity and Stress Response Component*), que presentan una elevada similitud entre sí, mostrando además un dominio N-terminal rico en cisteínas (Verna *et al*, 1997), y Mid2 y Mtl1, también homólogas entre sí, con un 50% de similitud a nivel de secuencia (Ketela *et al*, 1997; Rajavel *et al*, 1999).

De todos ellos, son Wsc1 y Mid2 los sensores más importantes de la ruta CWI (Gray *et al*, 1997; Jacoby *et al*, 1998; Verna *et al*, 1997; Rajavel *et al*, 1997). De hecho, la delección simultánea de los genes codificantes de ambos sensores da lugar a cepas no viables en ciertos fondos genéticos, aunque son capaces de crecer en presencia de un soporte osmótico (Rajavel *et al*, 1999). Ambos sensores son manosilados de forma específica por las manosiltransferasas Pmt2 y Pmt4, de la familia de proteínas Pmt. De esta forma, al igual que sucede con la doble delección de Wsc1 y Mid2, un doble mutante *pmt2Δ pmt4Δ* da lugar a cepas inviables (Strahl-Bolsinger *et al*, 1999).

El sensor Wsc1, también llamado Slg1, actúa como un muelle que permite detectar cambios mecánicos externos y de responder a diferentes estreses sobre la superficie de la pared celular (Verna *et al*, 1997; Dupres *et al*, 2009). Esta capacidad viene determinada por la región rica en serina y treonina, no por el dominio rico en cisteínas característico de las proteínas Wsc (Heinisch *et al*, 2010). Wsc1 posee en su parte citoplásmica dos regiones altamente conservadas fundamentales para la interacción con la GEF de Rho1, Rom2, y por tanto necesaria para la transducción de la señal. Estas dos regiones incluyen una tirosina en la posición 303 (próxima a la región transmembrana) y una secuencia cercana al extremo C-terminal (residuos del 369 al 375) (Vay *et al*, 2004). Entre ambas regiones existe una región reguladora (316-345) que puede ser fosforilada en cuatro residuos de serina. Cuando esta región reguladora se

encuentra fosforilada queda bloqueada su interacción con Rom2, inhibiéndose así su función. Por el contrario, en presencia de estrés se produce la desfosforilación de estas regiones desencadenándose así la señalización hacia la GEF (Vay *et al*, 2004). Wsc1 se encuentra distribuido por toda la superficie celular, principalmente en zonas de crecimiento polarizado (Verna *et al*, 1997). Dicha localización es dependiente de procesos de endo y exocitosis regulados por la proteína asociada al citoesqueleto Sla1. Una secuencia NPF_{XD}, incluida en la región 344-348 de la proteína, garantiza la correcta distribución del sensor (Piao *et al*, 2007; Gardiner *et al*, 2007). Respecto a la parte N-terminal de Wsc1, que se encuentra altamente glicosilada y que presenta un péptido señal (1-20), un dominio rico en cisteínas denominado WSC y una región rica en residuos de Ser y Thr, es esencial para la señalización de la respuesta a estrés (Lodder *et al*, 1999; Serrano *et al*, 2006; Bermejo *et al*, 2010). Cabe destacar que Wsc1 fue aislado como supresor multicopia de una mutación en el dominio catalítico de Fks1 que afecta a la síntesis de β -1,3-glucano (Sekiya-Kawasaki *et al*, 2002). Adicionalmente se demostró que una cepa delecionada en el gen *WSC1* muestra menor cantidad de β -1,3-glucano en la pared celular. De esta forma, el sensor estaría implicado en la regulación positiva de la actividad glucán sintasa (Sekiya-Kawasaki *et al*, 2002). Así, Wsc1 es responsable de la señalización de la presencia en el medio de inhibidores de la actividad glucán sintasa como la caspofungina (Reinoso-Martín *et al*, 2003). Frente a este fármaco se ha demostrado que es el dominio extracelular el responsable de la señalización (Bermejo *et al*, 2010). Wsc1 también está implicado en la señalización de la alcalinización del medio, induciendo de forma rápida la ruta CWI (Serrano *et al*, 2006). En el caso de la respuesta a estrés térmico (37-39°C) los sensores Wsc1, Wsc2 y Wsc3 juegan un papel relevante en la respuesta inmediata a un incremento de temperatura (Verna *et al*, 1997), estando el sensor Mid2 implicado en la señalización frente a tiempos más largos de exposición (Ketela *et al*, 1999) (Figura 4).

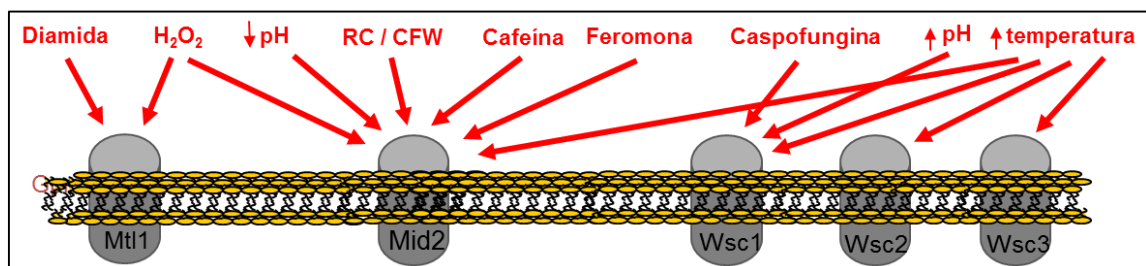


FIGURA 4. Esquema de la especificidad de señalización de los sensores de la ruta de integridad celular frente a diferentes estreses. Las siglas RC y CFW hacen referencia, respectivamente, a Rojo Congo y Blanco de Calcofluor.

El sensor Mid2 muestra un residuo Asn en posición 35 fundamental para detectar los daños en la pared. Una mutación en este residuo impide su N-glicosilación, lo que sugiere que la interacción de este N-glicano con la matriz extracelular es fundamental en el proceso de señalización (Hutzler *et al*, 2008). Presenta una región extracelular rica en serina y treonina (Rajavel *et al*, 1999) y una región citoplásmica con un dominio rico en aspártico (Marcoux *et al*, 2000), además de otro dominio de unión a calcio (Ono *et al*, 1994). La activación de la ruta CWI desde el sensor Mid2 está mediada por la interacción de su región citoplásmica con Rom2 (Green *et al*, 2003). Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con la señalización mediada por Wsc1, Mid2 puede interaccionar también con la GTPasa de Rho3 y Rho4 Rgd1 en condiciones de pH ácido, en las que induce la activación de la ruta CWI (Claret *et al*, 2005). También se ha descrito su interacción con un regulador negativo de la ruta CWI denominado Zeo1 (Green *et al*, 2003) y su capacidad de modular la activación del factor de transcripción Skn7, asociado a la respuesta a estrés osmótico, estrés oxidativo o anóxia (Ketela *et al*, 1999; Dastidar *et al*, 2012). Mid2 activa la ruta de integridad en presencia de compuestos que dañan la pared celular como el Rojo Congo (Bermejo *et al*, 2010) y el Blanco de calcofluor (CFW), compuesto frente al cual un mutante deleciónado en este sensor muestra resistencia (Ketela *et al*, 1999; de Nobel *et al*, 2000). La presencia de feromona también produce la activación de la ruta de integridad, necesaria para la formación de la nueva pared, a través de Mid2. De hecho, mutantes *mid2Δ* son hipersensibles a la presencia de esta en el medio (Errede *et al*, 1995). Por último, Mid2 es también responsable de la señalización mediada de cafeína (Ketela *et al*, 1999), peróxido de hidrógeno y diamida (Petkova *et al*, 2010) (Figura 4).

Pese a la especificidad en relación al tipo de estímulo, Wsc1 y Mid2 parecen exhibir cierto grado de recundancia funcional como se deduce de que la sobreexpresión de Wsc1 suprime la muerte inducida por feromonas en un mutante deleciónado *mid2Δ* (Marcoux *et al*, 1998). Por el contrario, la sobreexpresión de Mid2 suprime la muerte por alta temperatura que se produce en el mutante *wsc1Δ* (Ketela *et al*, 1999; Rajavel *et al*, 1999). Mid2 se localiza de forma homogénea por toda la superficie celular (Green *et al*, 2003), y a diferencia de Wsc1, no se concentra en zonas de crecimiento polarizado.

En cuanto a Mtl1, está implicado en la señalización causada por estrés oxidativo sobre la célula, como la diamida y el peróxido de hidrógeno (Vilella *et al*, 2005; Petkova *et al*, 2010).

2.2 Rho1 y Pkc1

Rho1 es un elemento esencial de la ruta de integridad celular. Es una de las 6 proteínas GTPasas de la familia RHO (Rho1, Rho2, Rho3, Rho4, Rho5 y Cdc42) y es la responsable de la transmisión de las señales externas desde los sensores hasta la proteína quinasa Pkc1. Rho1 es una proteína multifuncional cuya activación no solo deriva en la activación de la MAPK Slt2, sino que es también necesaria para la actividad de Fks1 (subunidad catalítica del complejo GS) (Mazur & Baginsky, 1996; Qadota *et al*, 1996). Se localiza en zonas de crecimiento polarizado.

Presenta un estado inactivo, unido a GDP y un estado activo, unido a GTP. De esta forma, Rho1 se encuentra regulado negativamente por las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs; *GTP Activating Protein*) Sac7, Bag7, Lrg1 y Bem2 (Martin *et al*, 2000; Roumanie *et al*, 2001; Pérez & Rincón, 2010). Sac7 y Bag7 están implicadas en el control del citoesqueleto de actina (Schmidt *et al*, 2002), Lrg1 regula el complejo GS actuando sobre Fks1 (Watanabe *et al*, 2001) y Bem2 y Sac7 están implicadas en la regulación negativa de Rho1 en su papel activador de Pkc1 (Schmidt *et al*, 2002). Por el contrario, está positivamente regulado por las GEFs Rom1, Rom2 y Tus1 (Ozaki *et al*, 1996; Schmelzle *et al*, 2002) (Figura 3).

Una vez activada, Rho1 se une y activa a Pkc1, codificada por el gen *PKC1* (Nonaka *et al*, 1995). A diferencia de lo que ocurre en otros organismos, en *S. cerevisiae* existe una única proteína Pkc1 (Levin, 2005). Se localiza en sitios de crecimiento polarizado y puede ser activada, aparte de por Rho1, por las proteínas quinasas Pkh1 y Pkh2, las cuales actúan modulando la actividad basal de Pkc1 (Inagaki *et al*, 1999; Friant *et al*, 2001). Pkc1, una vez activada, activa a su vez al primer elemento del módulo de MAP quinasas de la ruta de integridad celular, Bck1 (Lee & Levin; 1992).

2.3 EL MÓDULO DE MAP QUINASAS DE LA RUTA CWI

El módulo de MAP quinasas de la ruta de integridad celular (CWI) en *S. cerevisiae* está compuesto por la MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK) Bck1, las MAP quinasas quinasas (MAPKK) Mkk1 y Mkk2 y la MAP quinasa (MAPK) Slt2 (Lee & Levin, 1992; Irie *et al*, 1993; Torres *et al*, 1991).

Pkc1 fosforila al primer elemento de módulo de MAPKs Bck1 en varios residuos implicados en su activación (Ser 939, Thr 1119 y Ser 1134), localizados entre su dominio regulador N-terminal y catalítico C-terminal de serín treonín proteín quinasa (Levin *et al*, 1994).

Una vez activada, Bck1 fosforila a las MAPKKs Mkk1 y Mkk2, cuya activación por fosforilación es a su vez necesaria para la activación de la MAPK Slt2. La delección individual de alguna de estas dos MAPKKs no afecta a la transducción de la señal de la ruta CWI, sino que para bloquear por completo la activación de la ruta es necesaria la pérdida tanto de Mkk1 como de Mkk2. Por esta razón se ha propuesto que tienen un papel redundante, si bien es cierto que Mkk1 tiene una mayor importancia en la señalización (Martin *et al*, 2000; Jiménez-Sánchez *et al*, 2007).

Mkk1/Mkk2, una vez activadas, fosforilan y activan a la MAPK Slt2, último elemento del módulo (Torres *et al*, 1991). El efecto contrario de desfosforilación e inactivación de Slt2 es llevado a cabo por las fosfatasa Ptp2 y Ptp3 (Mattinson *et al*, 1999), la fosfatasa de especificidad dual Msg5 (Flández *et al*, 2004; Palacios *et al*, 2005) y por Sdp1, (Collister *et al*, 2002; Fox *et al*, 2007). La desfosforilación e inactivación de Slt2 por estas proteín fosfatasa es la principal forma de regulación tanto de la duración como de la intensidad de la respuesta desencadenada por la ruta CWI. De hecho, una activación descontrolada de Slt2 podría resultar perjudicial para la célula. Además, Slt2 ejerce un papel de retrofosforilación sobre Mkk1 y Mkk2, por lo que desempeña un papel de retroalimentación positiva sobre la ruta de integridad celular (Jiménez-Sánchez *et al*, 2007). Slt2 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, pudiendo además hacerlo en sitios de crecimiento polarizado (van Drogen & Peter, 2002).

2.4 LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA RUTA CWI

La fosforilación de la MAP quinasa Slt2 regula la activación de los factores de transcripción Rlm1 y SBF. La activación de estos dos factores de transcripción supone un cambio en el perfil de expresión génica de la levadura, necesario para el mantenimiento de la integridad celular (Sanz *et al*, 2018).

Rlm1 es el factor de transcripción que controla la expresión de la mayoría de genes que se inducen en situaciones de estrés sobre la pared celular (García *et al*, 2004; Sanz *et al*, 2012; Sanz *et al*, 2016). Está codificado por el gen *RLM1*

(*Resistant to Lethality of Mkk1^{S386P}*), que fue identificado por primera vez como el elemento cuya ausencia suprime la letalidad en condiciones de hiperactivación de la ruta generadas por el cambio de una serina por una prolina en la posición 386 de la MAPKK Mkk1 (Watanabe *et al*, 1995). Posee en su extremo N-terminal un dominio de unión al DNA de tipo *MADS* (*MCM1*, *Agamous Deficiens*, *Serum Response factor*). Como se describirá en detalle más adelante, en la región central de la proteína se encuentran las regiones susceptibles de fosforilación por Slt2. Por último, el extremo C-terminal contiene un dominio de activación transcripcional rico en asparaginas (Watanabe *et al*, 1997). La secuencia nucleotídica reconocida por Rlm1 para su unión al DNA fue definida como CTAWWWWTAG, la misma que reconoce el factor de transcripción de mamíferos MEF2 (Dodou & Treisman, 1997). Este dominio fue redefinido en 2004 como TAWWWWTAG (Boorsma *et al*, 2004). Rlm1 se localiza en el núcleo tanto en presencia como en ausencia de estrés sobre la pared celular, de forma independiente a su estado de fosforilación vía Slt2 (Jung *et al*, 2002). La activación de la ruta conduce a la fosforilación de Rlm1 por Slt2 en los residuos de serina 427 y treonina 439, los cuales son responsables de la mayor parte de la activación transcripcional (Jung *et al*, 2002). La unión de Rlm1 fosforilado a los promotores de genes dependientes de este factor y el ensamblaje de la maquinaria de iniciación de la transcripción, que requiere el reclutamiento de la RNA polimerasa II (Pol II), precisa de una alteración local del posicionamiento de nucleosomas en estos promotores, fenómeno que se produce mediante la cooperación entre los complejos multiprotéicos de remodelación de cromatina dependiente de ATP, SWI/SNF, y acetilador de histonas, SAGA (Sanz *et al*, 2012; Sanz *et al*, 2016). De esta forma, a través de la subunidad Snf2, el complejo SWI/SNF interacciona con Rlm1 y dirige su asociación a los promotores de los genes inducidos por la activación de la ruta CWI, desplazando los nucleosomas presentes en los sitios de unión del factor de transcripción (Sanz *et al*, 2012). Además, de forma dependiente de Slt2, Rlm1 y del complejo SWI/SNF, el complejo SAGA juega un papel importante en la inducción temprana y en la expresión génica sostenida en condiciones de estrés, acetilando la histona H3 presente en los promotores. Así, la actividad histona acetiltransferasa de la subunidad Gcn5 del complejo SAGA coopera con el complejo SWI/SNF en la remodelación de la cromatina necesaria para el ensamblaje del complejo transcripcional previo a la iniciación. Sin embargo, el reclutamiento de Rlm1, Snf2 y Pol II es solo ligeramente dependiente de Gcn5. Además, existe un grupo de genes, como es el caso de *YLR194C* y *SRL3*, cuya inducción es dependiente del complejo SWI/SNF pero independiente de SAGA, sugiriendo que la acetilación

de la histona H3 no es esencial en el desplazamiento de los nucleosomas en estos genes (Sanz *et al*, 2016).

El factor de transcripción SBF (*Swi4-Swi6 cell cycle box binding factor*) está formado por una subunidad de unión a DNA, Swi4, y una subunidad reguladora, Swi6 necesaria para la unión de Swi4 al DNA (Taba *et al*, 1991; Primig *et al*, 1992). Este factor de transcripción participa fundamentalmente en la activación de genes en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular (Igual *et al*, 1996; Iyer *et al*, 2001). Cepas mutantes *swi4Δ* y *swi6Δ* muestran fenotipos de sensibilidad frente a diferentes estreses de pared, lo que indicaría el papel de SBF en la homeostasis de la pared celular de la levadura. En la salida de la fase G1 Slt2 fosforila a Swi6 en el residuo Ser160, dejando libre a Swi4 que a su vez forma dímeros con Slt2 desencadenando la activación transcripcional (Igual *et al*, 1996; Spellman *et al*, 1998; Kim & Levin, 2010).

Además, en respuesta a estrés sobre la pared celular, la activación de SBF puede ser llevada a cabo por Slt2 y por su pseudoquinasa paróloga Mlp1 mediante un mecanismo no catalítico, donde ambas quinasas deben encontrarse en su conformación activada, es decir, fosforilada (Kim *et al*, 2008; Kim & Levin, 2010). Así, Slt2 o Mlp1 activadas interaccionan con Swi4 permitiendo la unión de este a los promotores de los genes en cuya transcripción está implicado este factor de transcripción, de forma independiente de Swi6 y del complejo SAGA. Sin embargo, Swi6 debe incorporarse al complejo para que se desarrolle la actividad transcripcional de SBF, ya que es necesaria para el reclutamiento de la RNA polimerasa II al complejo (Truman *et al*, 2009; Kim & Levin, 2011). Este mecanismo afecta la expresión de un número reducido de genes, en concreto *FKS2*, *CHA1*, *YLR042c* y *YKR013W* (Kim & Levin, 2010; Kim *et al*, 2008). Por lo tanto, la mayoría de la respuesta transcripcional de adaptación a estrés sobre la pared celular depende de la actividad del factor de transcripción Rlm1 en cooperación con los complejos remodeladores SWI/SNF y SAGA.

3. LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA RUTA CWI EN CONDICIONES QUE COMPROMETEN LA INTEGRIDAD CELULAR

Para garantizar la supervivencia celular frente a las diferentes situaciones de estrés que alteren la estructura de la pared celular se activa una respuesta denominada “mecanismo compensatorio” (Popolo *et al*, 2001; Smits *et al*, 2001). Este mecanismo permite a la célula modificar la estructura y la composición de la pared celular, permitiéndola así adaptarse a las condiciones adversas y garantizar la viabilidad celular.

El “mecanismo compensatorio” incluye un aumento importante en el contenido de quitina específicamente unido a la fracción de β -1,6-glucano en la pared celular (Smits *et al*, 2001; Valdivia & Schekman, 2003; Cabib *et al*, 2007), la modificación de las asociaciones que se producen entre los diferentes polímeros que componen la pared (Kapteyn *et al*, 1997), un incremento de proteínas presentes en la pared (de Nobel *et al*, 2000; Kapteyn *et al*, 1999), una redistribución del complejo glucán sintasa por la superficie de la pared celular (Delley & Hall, 1999) y la activación transcripcional de un grupo específico de genes relacionados con la pared celular, asociado a estos eventos (Sanz *et al*, 2018).

El desarrollo de técnicas de análisis genómico global como los *microarrays* de DNA han permitido caracterizar los perfiles transcripcionales de la levadura en una gran variedad de condiciones experimentales, incluidas situaciones donde se altera o afecta funcionalmente la pared celular. Las condiciones experimentales en las que se han desarrollado este tipo de estudios incluyen tanto situaciones de estrés constitutivo sobre la pared celular, como situaciones donde el daño causado sobre la misma es transitorio. Dentro del primer grupo han sido analizados los perfiles transcripcionales en diversos mutantes como *gas1 Δ* (β -1,3-glucanosil transferasa), *fks1 Δ* (subunidad catalítica de la β -1,3-glucán sintasa), *mnn9 Δ* (manosil transferasa), *kre6 Δ* (implicada en la síntesis de β -1,6-glucano) y *Knr4 Δ* (implicada en la regulación de la biosíntesis de la pared celular) (Lagorce *et al*, 2003). Respecto al segundo grupo, destaca la obtención del transcriptoma de la levadura en presencia de agentes que causan daños sobre la pared celular como el Rojo Congo y el Blanco de calcofluor, compuestos que afectan el correcto ensamblaje de la pared uniéndose a la quitina, (Roncero & Durán, 1985; Boorsma *et al*, 2004; Garcia *et al*, 2004), la zimoliasa, un cóckel

enzimático con actividad β -1,3-glucanasa y quitinasa (García *et al*, 2009) o la caspofungina (Reinoso-Martín *et al*, 2003; Agarwall *et al*, 2003; Bermejo *et al*, 2010). El análisis comparativo de todos estos estudios transcripcionales ha permitido proponer la existencia de respuestas transcripcionales específicas de daño, y de un grupo común de respuesta, fenómeno que se ha propuesto como “huella transcripcional” de la respuesta frente a situaciones de estrés sobre la pared celular (Arroyo *et al*, 2009). Dentro de este grupo se incluyen genes relacionados con el metabolismo y la generación de energía, con la biosíntesis de la pared celular, con procesos morfogenéticos, con transducción de señales y con la respuesta a estrés general.

Es importante destacar que la regulación transcripcional anteriormente descrita está controlada mayoritariamente a través de la ruta CWI mediante la MAP quinasa Slk2 y el factor de transcripción Rlm1.

4. OTRAS RUTAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE LA PARED CELULAR

De forma adicional a la ruta CWI, existen otras rutas de señalización celular implicadas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular.

La presencia de feromonas de tipo sexual opuesto en el medio activa la ruta de apareamiento, controlada por la MAP quinasa Fus3 (Bardwell, 2005). Estas feromonas interaccionan con receptores de membrana de células haploides de tipo sexual opuesto comenzando así un proceso de polarización seguido de una etapa de prolongación celular, clave en el proceso de apareamiento (*shmoo*). Estas prolongaciones se fusionan dando lugar a un cigoto diploide. Para el correcto desarrollo de estos cambios morfológicos que incluyen la remodelación de la pared celular, así como para el mantenimiento de la integridad de la misma tras las diferencias de turgencia que provoca el crecimiento polarizado se produce la activación transitoria de la ruta CWI (Buehrer & Errede, 1997; Errede *et al*, 1995). La implicación de la ruta de integridad celular se deduce del hecho de la hipersensibilidad que se observa en los mutantes *slt2Δ* y *mid2Δ* a la presencia de feromona (Errede *et al*, 1995). Este dato fenotípico sugiere además que sería el receptor Mid2 el que actuaría como sensor del efecto causado por la feromona. Además, la GTPasa Rho1 es reclutada a los sitios de crecimiento durante la etapa de *shmoo*, así como la proteína quinasa Pkc1, que se localiza

también en las puntas de las proyecciones de apareamiento durante la reproducción sexual (Bar *et al*, 2003).

En esta misma línea, durante el proceso de crecimiento invasivo que se produce en condiciones de ausencia de nutrientes regulado por la ruta de filamentación, gobernada por la MAP quinasa Kss1, se produce la activación de genes implicados en los cambios morfológicos necesarios durante este proceso, muchos de los cuales, como *YRL42C*, *PST1*, *MID2*, *YLR414C* o *YPS1* (Madhani & Fink, 1999) están regulados por la ruta de integridad celular y su activación es dependiente de la activación transitoria de Slt2. Así mismo, Kss1 también participa en la ruta SVG (*STE Vegetative Grown*), que está implicada en el mantenimiento de la estabilidad de la pared celular de forma paralela a la ruta de integridad celular (Cullen *et al*, 2000). La MAPK Fus3 mantiene inhibida esta ruta en condiciones basales, que se activa en condiciones que causen defectos en la glicosilación de proteínas de la pared. Así, la señalización mediada por esta ruta puede modular la expresión de genes que codifican para elementos importantes para la construcción de la pared, como es por ejemplo el caso de *FKS2* o *FUS1* (Cullen *et al*, 2000).

De igual forma, la ruta de esporulación que en ausencia de nutrientes induce el proceso de producción de ascosporas, también regula la expresión de genes implicados en la construcción de la nueva pared, tales como *FKS2* y *CHS3* (Iwamoto *et al*, 2005).

Por otro lado, los cambios en la concentración de soluto del medio suponen una pérdida de turgencia celular incompatible con la viabilidad de la misma, por lo que es necesaria una rápida adaptación a la nueva presión osmótica, que se logra mediante una rápida síntesis del glicerol que mantiene el equilibrio osmótico entre el medio interno y externo. Esta respuesta está regulada por la ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*), a través de la MAP quinasa Hog1. La regulación de la turgencia celular se encuentra asociada a cambios rápidos en la pared celular, por lo que es necesaria una fina coordinación entre las rutas HOG y CWI (Davenport *et al*, 1995).

Una vez Hog1 es activada se transloca al núcleo donde a su vez se une, fosforila y activa a varios factores de transcripción como Msn1, Smp1 y Msn2/4, que se unen a genes con motivos STRE (*Stress Response Elements*) en sus promotores (de Nadal *et al*, 2003; Alepuz *et al*, 2001). Estos motivos están presentes en un número significativo de genes implicados en el mantenimiento de la integridad

de la pared celular (Lagorce *et al*, 2003; García *et al*, 2004). Otros factores de transcripción regulados por Hog1 son Sko1 (Rep *et al*, 2001), Hot1 (Rep *et al*, 1999) y Skn7 (Alberts *et al*, 1998; Brown *et al*, 1994). Este último factor de transcripción es responsable de la activación de genes como *OCH1*, responsable de la síntesis de una manosiltransferasa implicada en la síntesis de glicoproteínas de la pared celular (Li *et al*, 2002). Este hecho, junto con la interacción directa que se produce entre Skn7 y Rho1 sugiere una conexión entre las rutas HOG y CWI. En condiciones de estrés hiperosmótico, la MAPK Slt2 es activada transitoriamente (entre los 45 y los 60 minutos de exposición) a través del sensor Mid2 (García-Rodríguez *et al*, 2005). Este hecho sugiere que la activación de la MAPK Slt2 no es una consecuencia de la pérdida inicial de la turgencia celular sino del proceso de recuperación del equilibrio osmótico. Así, el significado biológico de la activación de Slt2 por estrés hiperosmótico podría estar relacionado con la necesidad de la célula de fortalecer la pared celular. Otro daño sobre la pared celular que activa de forma coordinada la ruta CWI y la ruta HOG es el tratamiento con zimoliasa. Este cócktel enzimático activa las MAPKs de ambas rutas, Slt2 y Hog1, siendo la activación de Slt2 en estas condiciones dependiente de los elementos de la rama Hkr1/Sho1 de la ruta HOG y además de la presencia de parte de los componentes esenciales de la ruta de integridad como Mkk1/Mkk2, Bck1, Pkc1 y Rho1, pero no de los sensores ni de las GEFs de dicha ruta (Bermejo *et al*, 2008; Garcia *et al*, 2009; Rodríguez-Peña *et al*, 2013). Así, se ha propuesto que el daño causado sobre la pared celular por la zimoliasa se señala a través del sensor Hkr1 de la rama Sho1 de la ruta HOG (Rodríguez-Peña *et al*, 2013; Bermejo *et al*, 2008) dando lugar a una activación secuencial de ambas rutas. Desde un punto de vista de la respuesta transcripcional frente a zimoliasa, y en concordancia con las rutas de MAP quinasas implicadas, esta incluye dos grupos de genes regulados de forma diferente. Un grupo consiste básicamente en genes Hog1, Slt2 y Rlm1 dependientes, inducidos también en otras condiciones de estrés sobre la pared celular, y un segundo grupo de genes cuya expresión depende de Hog1 y en un alto porcentaje de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 (Garcia *et al*, 2009), pero no de Slt2 ni de Rlm1 siendo la mayoría de estos últimos también inducidos en condiciones de estrés hiperosmótico.

Además de las rutas de MAP quinasas anteriormente descritas otras rutas participan en la remodelación de la pared celular en situaciones de estrés, como es el caso de la ruta de respuesta a calcio o de la calcineurina (Cyert & Philpott, 2013; Ly & Cyert, 2017). La activación de esta ruta se inicia a partir de dos proteínas transmembrana, Cch1 y Mid1, que son además componentes del canal

de entrada de calcio en la célula (Roy *et al*, 2007). La activación de Chh1 y Mid1 implica la activación de la enzima Calcineurina, fosfatasa con dos subunidades reguladoras que unen Ca^{2+} (Calmodulina y Cnb1) y dos subunidades catalíticas (Cna1 y Cna2) (Cyert, 2003). La calcineurina a su vez activa el factor de transcripción Crz1, que se une a promotores de genes que presentan en su secuencia motivos CDRE (*Calcineurin Dependent Response*) (Cyert *et al*, 2003). Mutaciones combinadas en genes implicados en la construcción de la pared celular como *slt2Δ* o *fks1Δ* con la delección en *CNB1* resultan letales, lo que sugiere que la ruta de la calcineurina juega un papel relevante en la regulación de los procesos de construcción de la pared celular. Apoyando esta idea, genes codificantes de proteínas relacionadas principalmente con la pared celular, como la proteasa Yps1, la exoglucanasa Scw10, la transglucosilasa Crh1 y la manosiltransferasa Mnn4, inducen su expresión en condiciones de aumento de la concentración de Ca^{2+} de forma dependiente del factor de transcripción Crz1 (Yoshimoto *et al*, 2002).

5. REGULACIÓN DEL CONTROL NUTRICIONAL EN *S. cerevisiae*

Las células de levadura adaptan su crecimiento y su metabolismo a las condiciones nutricionales del medio. De esta forma, la levadura, en base a la disponibilidad nutricional, es capaz de ajustar su tasa de crecimiento modulando su ciclo celular (Brauer *et al*, 2008).

En condiciones de limitación de nutrientes *S. cerevisiae* es capaz de adaptarse mediante diferentes mecanismos tales como el crecimiento filamentoso, pasando así las células a un estado de quiescencia y de resistencia que se mantiene hasta el momento en que el acceso a nutrientes deja de ser un factor limitante. Además, en la levadura los nutrientes no son sólo sustratos necesarios para el crecimiento, sino que actúan también como elementos de señalización reguladores del metabolismo. De esta forma, en la regulación del control nutricional los nutrientes son necesarios para el aumento de la biomasa y la generación de energía, así como para la regulación de procesos metabólicos y transcripcionales, encaminados a la adaptación de la célula a las condiciones del medio en el que encuentran y garantizando así su supervivencia en condiciones de adversidad en cuanto a la disponibilidad de nutrientes. *S. cerevisiae* responde fundamentalmente a la presencia o ausencia en el medio de fuentes de carbono, nitrógeno, fosfato y aminoácidos (Magasanik & Kaiser, 2002; de Virgilio & Loewith, 2006; Smets *et al*, 2010).

A diferencia de los mensajeros primarios habituales en rutas de señalización que presentan un receptor único y específico, la presencia de nutrientes puede ser señalizada mediante diferentes elementos, lo que complica su estudio. Así, la detección de los nutrientes puede producirse a partir de sus metabolitos secundarios que actúan como segundos mensajeros o a partir de enzimas convertidoras de metabolitos (Orlean, 2012). Sin embargo, ambos sistemas de detección pueden ser dependientes entre sí. En levaduras el principal sistema de detección de nutrientes son proteínas receptoras localizadas en la membrana plasmática, las cuales actúan como ligandos uniéndose de forma directa a los mismos. En base a esto, por un lado es necesaria una vía de señalización de nutrientes que responda a la presencia o ausencia de los mismos y que regule la absorción y metabolismo de estos nutrientes y, por otro, deben existir rutas generales cuya activación es dependiente de la previa detección de la presencia o ausencia del nutriente y que están encaminadas a la regulación de los mecanismos de adaptación frente a la disponibilidad de dichos nutrientes, tales como la tasa de crecimiento, el control del ciclo celular, la tolerancia a estrés, el control de compuestos de almacenamiento, el envejecimiento, el crecimiento pseudohifal o el crecimiento invasivo.

A continuación se describe en detalle la ruta cAMP/PKA (**Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate – Protein Kinase A**) (Figura 5), que es una de las rutas de señalización más importante que participa en el control nutricional en *S. cerevisiae*.

5.1 LA RUTA cAMP/PKA

Entorno al 90% de los genes cuya expresión se modula en función de la ausencia o presencia de glucosa están controlados por la ruta cAMP/PKA. Mediante esta ruta, en presencia de glucosa se reprimen genes de resistencia a estrés y genes implicados en la adaptación a la ausencia de esta fuente de carbono, como por ejemplo genes de entrada en fase estacionaria, y por el contrario, se inducen genes implicados en el proceso de fermentación y la proliferación celular (Thevelein & de Winder, 1999; Santangelo, 2006; Smets *et al*, 2010). Aunque es la presencia o ausencia de glucosa el principal elemento que determina la activación o inhibición de la ruta cAMP/PKA otros nutrientes esenciales para el crecimiento celular también actúan como estímulo en cuanto a la regulación de esta ruta. Existen dos mecanismos paralelos implicados en la detección de la glucosa. Por un lado el sistema GPCR, que consta del sensor Gpr1 que detecta

la glucosa extracelular y de Gpa2, la subunidad α de la proteína G asociada. Las proteínas G conducen la señal desde el receptor correspondiente hasta una o más proteínas efectoras. Por otro lado existe un sistema de detección intracelular dependiente de una actividad hexoquinasa que fosforila la glucosa en el interior de la célula. Finalmente, ambos sistemas modulan la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC), que cataliza la síntesis del AMP cíclico intracelular (AMPc) y cuyos niveles son el principal elemento regulador de la proteína PKA (Figura 5).

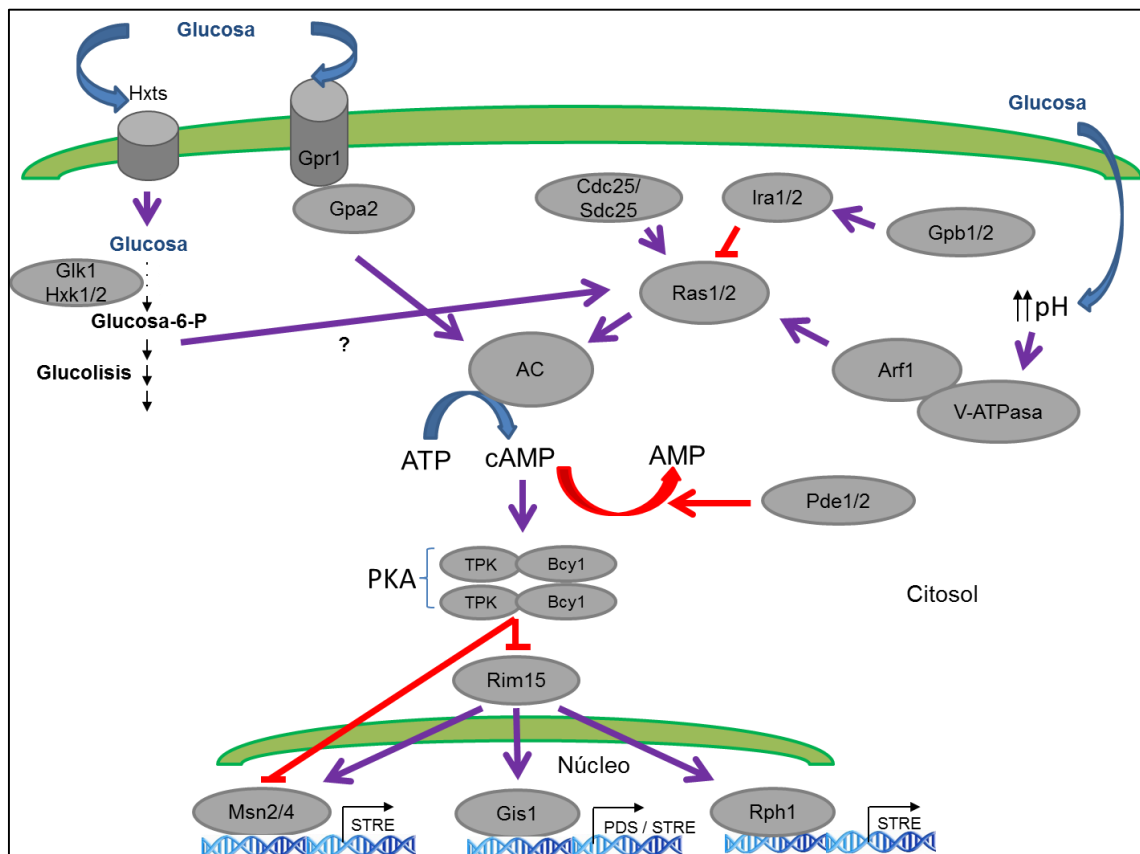


FIGURA 5. Esquema de la ruta cAMP/PKA en *Saccharomyces cerevisiae*. Hxts: Familia de proteínas transportadoras de hexosas.

5.1.1 El sistema de detección de glucosa GPCR

El sistema de detección de glucosa GPCR consta del receptor transmembrana de glucosa Gpr1 y de Gpa2, subunidad α de la proteína G. (Xue *et al*, 1998; Kraakman *et al*, 1999; Harashima & Heitman, 2002). Tras la detección de la glucosa extracelular por el receptor Gpr1, se produce la activación de la subunidad Gpa2 mediante su unión a GTP. En estas condiciones, Gpa2-GTP activa la adenilato ciclasa (AC), aumentando de esta forma el nivel intracelular de AMPc (Peeters *et al*, 2006; Belotti *et al*, 2012), lo que a su vez da lugar a la

activación de la proteína PKA, como se describirá más adelante. En ausencia de glucosa, Gpa2 se encuentra unida a GDP y no interacciona con la AC. La sobreexpresión de *GPA2* presenta un fuerte incremento de los niveles de AMPc intracelular, sin embargo, una cepa delecionada en este gen aún muestra un cierto incremento de AMPc en respuesta a un aumento de glucosa (Nakafuku *et al*, 1988; Papasavvas *et al*, 1992). No obstante, existen datos que cuestionan la importancia cuantitativa de la vía GPRC en la activación de la ruta cAMP/PKA. En primer lugar, la afinidad de Gpr1 por la glucosa es mucho menor que la que muestra frente a otras fuentes de carbono como la de sacarosa (Lemaire *et al*, 2004). En segundo lugar, la deleción de los genes *GPR1* o *GPA2* no afectan a la reconfiguración transcripcional que se produce por la presencia de glucosa (Zaman *et al*, 2009). Por último, Gpa2-GTP es incapaz de activar a la enzima adenilato ciclasa si esta previamente no ha sido sensibilizada por las proteínas Ras (Rolland *et al*, 2000).

5.1.2 Las proteínas Ras

Las proteínas Ras forman parte de una subfamilia eucariota de GTPasas implicadas en la transducción de señales en la célula. En *S. cerevisiae* se han descrito las proteínas Ras1 y Ras2, homólogas al protooncogen Ras de mamíferos (Powers *et al*, 1984; Toda *et al*, 1986). Estas dos proteínas activan de forma redundante a la enzima AC, codificada por el gen *CYR1* (Kataoka *et al*, 1985). La activación o inhibición de Ras1 y Ras2 está modulada por su unión a GDP o a GTP. Así, en condiciones de disponibilidad de glucosa estas proteínas muestran su forma activa en unión a GTP, mientras que en ausencia de esta fuente de carbono se muestran inhibidas unidas a GDP (Broach & Deschenes, 1990). La activación de Ras1 y Ras2 es dependiente de los factores intercambiadores de nucleótidos (GEFs) Cdc25 y su homólogo Sdc25, que intercambian GDP por GTP (Boy-Marcotte *et al*, 1996). Por el contrario, la inhibición de las proteínas Ras en *S. cerevisiae* está mediada tanto por su actividad GTPasa intrínseca como por las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) Ira1 e Ira2, que intercambian GTP por GDP (Broek *et al*, 1987; Takana *et al*, 1990; BoyMarcotte *et al*, 1996) (Figura 5). De esta forma la proporción de GDP/GTP unido a las proteínas Ras, fruto de un equilibrio de reacciones competitivas, determina a través de los niveles de activación de la AC la cantidad de AMPc intracelular y el nivel de activación de PKA (Figura 5). Así, en condiciones de activación de Ras se produce un rápido aumento del AMPc intracelular (Colombo *et al*, 1998). En la regulación de Ras1 y Ras2 también

participan las proteínas Gpb1 y Gpb2, las cuales tienen una función estabilizadora de las GAPs Ira1 e Ira2, por lo que son reguladores negativos indirectos de Ras1 y Ras2 (Figura 5) (Lu & Hirsch, 2005; Budhwar *et al*, 2010). Gpb1 y Gpb2 también pueden ejercer una regulación negativa de la ruta cAMP/PKA afectando a la interacción entre Gpr1 y Gpa2, bloqueando así esta vía de señalización (Harashima & Heitman, 2005).

Ras1 y Ras2 contienen en su extremo C-terminal unos dominios transmembrana responsables del anclaje de estas proteínas a la membrana plasmática (Kato *et al*, 1992). Recientes estudios de localización han determinado que Ras1 y Ras2, al igual que algunos de sus efectores como Ira1 e Ira2 y algunos de los elementos sobre los que actúan como la AC también se encuentran anclados a las membranas de compartimentos internos como el retículo endoplasmático, las mitocondrias o el núcleo (Belotti *et al*, 2011, 2012; Dong & Bai, 2011; Broggi *et al*, 2013). La localización de Ras1 y Ras2 es dependiente tanto de la disponibilidad o no de glucosa como de la localización de otros elementos de la ruta cAMP/PKA, como son las subunidades catalíticas de la proteína PKA (Wang & Deschenes, 2006). La proteína glicolítica Hxk2, cuya ausencia induce a una translocación de Ras a las mitocondrias y a la muerte celular, también juega un papel determinante en la localización de las proteínas Ras (Broggi *et al*, 2013). De esta forma la distribución intracelular de Ras1 y Ras2 también juega un papel regulador de la actividad de la ruta cAMP/PKA.

Otro elemento que regula la actividad de las proteínas Ras es el pH citosólico, modulado a su vez por el metabolismo de la glucosa. La acidificación del medio interno en las células privadas de glucosa produce el desensamblaje y la inactivación de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), un complejo que actúa como una bomba de protones necesaria para la acidificación de la vacuola y cuyo ensamblaje y actividad son regulados por el pH, y es requerida para la activación de la ruta cAMP/PKA en respuesta a glucosa (Dechant *et al*, 2010). En presencia de glucosa en el medio, la V-ATPasa activada recluta a la GTPasa Arf1, necesaria para la activación de las proteínas Ras (Dechant & Peter, 2011; Dechant & Peter, 2014; Dechant *et al*, 2014). De esta forma, el pH citosólico, modulado a través de la disponibilidad de glucosa, regula la actividad de Ras de forma paralela a Cdc25 e Ira 1/2.

A diferencia de lo observado con la doble delección de *GPR1* y *GPA2*, la pérdida simultánea de Ras1 y Ras2 genera un fenotipo letal, al igual que la delección del gen *CYR1*. Esta letalidad es rescatada con la delección del gen de la subunidad

reguladora de la proteína PKA, *BCY1*, ya que en ausencia de este elemento regulador la activación de PKA es constitutiva e independiente del nivel de AMPc intracelular (Tamanoi, 2011).

5.1.3 La proteína PKA

La proteína quinasa A (PKA) es un heterotetrámero formado por dos subunidades reguladoras idénticas, codificadas por el gen *BCY1* y por dos subunidades catalíticas codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* (Toda *et al*, 1987). En presencia de glucosa aumentan los niveles de AMPc intracelular, el cual se une a las subunidades reguladoras Bcy1, provocando su desfosforilación y liberando a las dos subunidades catalíticas (Toda & Sass, 1988). Una vez disociadas de Bcy1, las subunidades catalíticas desarrollan su actividad (Griffioen *et al*, 2001) (Figura 5). Por el contrario, en ausencia de glucosa se produce un descenso en los niveles de AMPc, impidiendo la desfosforilación de Bcy1 y por tanto su disociación de las subunidades catalíticas, quedando así bloqueada la actividad quinasa de estas. Se han identificado 17 sitios de fosforilación de Bcy1 distribuidos en tres grupos, todos ubicados en la región N-terminal de la proteína, lo que indica el grado de complejidad de su regulación. El primer cluster de fosforilación de Bcy1 consta de los sitios S68, S70, S74, S77, S79, S81, S83 y S84. El segundo cluster, que fue el primero en ser identificado, incluye los residuos T144, S145, S147, T150 y T160. Por último, el tercer y último grupo está constituido por los sitios T129, S130 y T131 (Griffioen *et al*, 2001; Soulard *et al*, 2010). Mientras que la regulación positiva de PKA a través de los niveles de AMPc intracelular depende de las proteínas Ras y de la vía Gpr1/Gpa2, la regulación negativa está mediada por las fosfodiesterasas Pde1 y Pde2, que catalizan la conversión de AMPc a AMP (Sass *et al*, 1986; Nikawa *et al*, 1987). La afinidad de Pde2 por el AMPc es entorno a 1000 veces superior que la de Pde1 (Vandamme *et al*, 2012). De hecho, PKA ejerce una fuerte retroalimentación negativa sobre los niveles de AMPc con la finalidad de autoregular su actividad enzimática. De esta forma con la finalidad de mantener estable y controlada la actividad PKA en condiciones de elevada disponibilidad de glucosa, y por tanto de AMPc, las propias subunidades TPKs fosforilan a la subunidad Bcy1, especialmente en el residuo S145 activándola y rebajando así la propia actividad de las subunidades catalíticas (Griffioen *et al*, 2001). Además, las subunidades catalíticas Tpk1, Tpk2 y Tpk3 tienen la capacidad de activar por fosforilación a la fosfodiesterasa Pde1, contribuyendo a mantener estable la actividad PKA (Ma *et al*, 1999). PKA controla también la actividad de Pde2

regulando tanto su concentración como su localización subcelular, de forma que esta fosfodiesterasa juega un importante papel en el mecanismo de retroalimentación a través del cual PKA regula los niveles basales de AMPc (Hu *et al*, 2010).

Por otro lado, la regulación de la actividad de PKA también puede producirse de forma independiente al AMPc, fenómeno que supone un mecanismo de control añadido. Las proteínas Gpb1 y Gpb2, que como se mencionaba anteriormente participan en la regulación negativa de la ruta cAMP/PKA vía Ira1/2, también ejercen una acción directa sobre PKA, estabilizando la unión entre las subunidades reguladoras y las subunidades catalíticas, contribuyendo por tanto a su inhibición (Lu & Hirsch, 2005; Budhwar *et al*, 2010). Además, la proteína quinasa Yak1, que en condiciones limitantes de nutrientes presenta localización nuclear, también participa en la activación de Bcy1 mediante fosforilación en la región N-terminal de esta subunidad, induciendo así su migración al citoplasma (Griffioen *et al*, 2001).

Inicialmente, las subunidades catalíticas de PKA, Tpk1, Tpk2 y Tpk3, parecían tener una función redundante, ya que la actividad en solitario de cualquiera de las tres era suficiente para garantizar la viabilidad celular. Sin embargo, estudios específicos sobre cada una de las subunidades han aportado algunos matices a esta afirmación. Por ejemplo, Tpk2 estimula el crecimiento pseudohifal, mientras que Tpk1 y Tpk3 lo inhiben (Robertson & Fink 1998; Malcher *et al*, 2011). Por otro lado, mediante estudios de interacciones *in vitro* se ha determinado que las especificidades de sustrato de cada una de las subunidades son considerablemente diferentes (Ptacek *et al*, 2005).

5.1.4 Las dianas de la proteína PKA

En condiciones de activación de la ruta cAMP/PKA, esta actúa positivamente sobre elementos relacionados con el crecimiento fermentativo y con la acumulación de masa celular y negativamente sobre elementos implicados en el crecimiento en presencia de fuentes de carbono no fermentables (respiración), o en fase estacionaria y elementos relacionados con la respuesta a estrés (Thevelein & de Winde, 1999; Zaman *et al*, 2009).

Aunque las subunidades catalíticas de PKA pueden regular mediante eventos de fosforilación la actividad de diferentes proteínas citoplasmáticas, como por

ejemplo la trehalasa (Schepers *et al*, 2012), la piruvato quinasa (Portela *et al*, 2002) y la fructosa-1, 6-bisfosfatasa (Rittenhouse *et al*, 1987), la ruta cAMP/PKA destaca por su papel en la regulación transcripcional de genes cuya actividad es dependiente de la disponibilidad de glucosa. De hecho el 90% de los genes que se activan o reprimen en función a la disponibilidad de esta fuente de carbono están regulados por esta ruta.

A continuación se describen en detalle los principales efectores implicados en la regulación transcripcional modulada por PKA.

5.1.4.1 La proteína quinasa Rim15

Rim15 (*Regulator of IME2*) es una serín treonin proteína quinasa de 1770 aminoácidos implicada en la regulación de la expresión génica durante la primera fase de la meiosis, afectando a la remodelación de la cromatina (Vidan & Mitchell, 1997), y en la entrada de las células en fase estacionaria (Swinnen *et al*, 2006).

En condiciones nutricionales no restrictivas, Rim15 muestra localización citoplasmática, anclado a la proteína citosólica Bmh2. Así, en presencia de glucosa es fosforilado por PKA, que se encuentra activa, en cinco sitios consenso de fosforilación por esta proteína (RRXS), fenómeno que inhibe la actividad quinasa de Rim15 (Reinders *et al*, 1998). El complejo *TORC1* también está implicado en la regulación de Rim15. Este complejo, en su forma activada en presencia de nitrógeno fosforila a Rim15 en la treonina localizada en la posición 1075, que interacciona con la proteína de anclaje citoplásmica Bmh2, favoreciendo así su unión a esta y quedando secuestrado en el citoplasma (Pedruzzi *et al*, 2003; Wanke *et al*, 2008; Swinnen *et al*, 2014). La proteína quinasa Sch9, una de las dianas de *TORC1*, también participa en el mecanismo de regulación de Rim15, estando implicada en su retención en el citoplasma en condiciones de disponibilidad de nutrientes mediante la fosforilación de la serina localizada en la posición 1061, también sitio de unión de Bmh2 (Wanke *et al*, 2005; Wanke *et al*, 2008; Swinnen *et al*, 2006). De esta forma, en condiciones nutricionales limitantes, en las cuales se produce la inhibición de PKA, *TORC1* y Sch9, se produce la liberación y activación de Rim15 y su translocación al núcleo. Este complejo mecanismo de regulación hace de la proteína quinasa Rim15 un elemento de conexión entre las diferentes rutas de control nutricional. Como mecanismo adicional de regulación, la autofosforilación de Rim15 favorece su

migración al núcleo a través de la proteína Msn5, implicada en el transporte de proteínas a través de la membrana nuclear (Swinnen *et al*, 2006).

Cepas delecionadas en el gen *RIM15* muestran un bloqueo en la activación transcripcional de genes activados por los factores de transcripción Gis1 y Msn2/4 cuya regulación está mediada por la ruta cAMP/PKA (de Virgilio *et al*, 2000; Martínez-Pastor *et al*, 1996). De esta forma, Rim15 juega un papel de mediación entre PKA y Gis1 y Msn2/4 activando a estos factores de transcripción en el núcleo en condiciones de inhibición de la ruta cAMP/PKA como consecuencia de la ausencia de glucosa (Cameroni *et al*, 2004). Estudios *in vitro* han confirmado la fosforilación directa por Rim15 de Msn2 y Hsf1 (factor de transcripción de genes que se inducen en respuesta a shock térmico), pero no de Gis1, (Lee *et al*, 2013), lo que sugiere que este es el mecanismo por el cual esta proteína quinasa activa los dos primeros factores de transcripción. No obstante, la regulación ejercida desde PKA hacia Msn2/4 puede ser directa sin mediación de Rim15 (Görner *et al*, 1998). Respecto al factor de transcripción Gis1 su activación por Rim15 es un proceso indirecto mediado por las endosulfinas Igo1/2 y la subunidad Cdc55 de la fosfatasa 2A (PP2A^{Cdc55}) (Bontron *et al*, 2013). En ausencia de glucosa en el medio, Rim15 activa por fosforilación a Igo1/2, las cuales inhiben Cdc55. La inhibición de esta fosfatasa mantiene Gis1 en un estado fosforilado e inactivo (Sarkar *et al*, 2014). Finalmente, Rim15 regula negativamente el factor de transcripción Rph1, implicado en la represión de varios genes ATG, relacionados con la autofagia. Así, en condiciones de ausencia de nitrógeno, Rim15 fosforila Rph1 inhibiendo de esta forma su función (Bernard *et al*, 2014).

5.1.4.2 Los factores de transcripción regulados por PKA

5.1.4.2.1 Msn2 y Msn4

Los factores de transcripción parcialmente redundantes Msn2 (*Multicopy suppressor of SNF1 mutation*) y Msn4 son dos elementos reguladores clave en la respuesta a estrés general en *S. cerevisiae* (Estruch & Carlson, 1993; Schüller *et al*, 1994). Controlan la expresión de una serie de genes que codifican para proteínas necesarias en situaciones de estrés. Tanto Msn2 como Msn4 reconocen las secuencias específicas STRE (*Stress-Response Element*) (AGGGG) presentes en los promotores de los genes bajo su control (Estruch & Carlson, 1993; Martínez-Pastor *et al*, 1996; Schmitt & McEntee, 1996). Entre los

genes cuya expresión es dependiente de Msn2/4 se encuentran los relacionados con crecimiento en ausencia de glucosa, estrés térmico, estrés oxidativo y estrés osmótico (Martínez-Pastor *et al*, 1996; Petkova *et al*, 2010). Estos factores de transcripción presentan dominios de dedos de zinc Cys₂His₂ mediante los cuales se acoplan a los promotores de los genes con secuencias STRE (Görner *et al*, 1998). En condiciones de crecimiento con la apropiada disponibilidad de nutrientes y ausencia de estrés estos factores de transcripción se encuentran inhibidos. Esta inhibición está controlada por la ruta cAMP/PKA. De hecho, la proteína PKA fosforila a Msn2/4 en el citoplasma, impidiendo así su migración al núcleo (Marchler *et al*, 1997; Hiesinger, 1997; Medvedik *et al*, 2007). Por el contrario, en ausencia de glucosa en el medio se produce la desfosforilación de Msn2/4 por la proteína fosfatasa 1 (PP1) y la migración al núcleo de este factor de transcripción (Cameroni *et al*, 2004; Jacquet *et al*, 1997; de Weber *et al*, 2005) (Figura 5), donde se asocia a los promotores de los genes correspondientes en un proceso en el que participa la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2A Cdc55 (PP2A^{Cdc55}) (Reiter *et al*, 2013). Una vez la célula se ha adaptado el estrés que indujo la translocación al núcleo y la activación de Msn2/4 estos factores se relocalizan en el citoplasma en un proceso mediado por la proteína exportadora Msn5 (Durchschlag *et al*, 2004; Sunnaker *et al*, 2013).

Msn2 y Msn4 presentan varias regiones determinantes para su funcionalidad. En la región C-terminal se encuentra el dominio implicado en la formación de los dedos de zinc, seguido del cual se encuentra la región de localización nuclear (NLS), responsable de la translocación al núcleo de Msn2 y Msn4. También en la región C-terminal se encuentra la región de exportación nuclear (NES), a través de la cual la proteína exportadora Msn5 media el regreso de estos factores de transcripción al citoplasma. En la región N-terminal se encuentra el dominio esencial de activación transcripcional (TAD), implicado en la activación de Msn2/4 y posible diana de Rim15 (Lallet *et al*, 2006; Boy-Marcotte *et al*, 2006).

5.1.4.2.2 Gis1 y Rph1

Otros factores de transcripción controlados por la ruta cAMP/PKA son Gis1 y Rph1. Gis1 (*Glg1-2 supressor*) regula la expresión de genes fundamentalmente relacionados con la fase postdiáuxica de crecimiento (Pedruzzi *et al*, 2000; Orzechowski-Westholm *et al*, 2012). Los genes regulados por Gis1 presentan en sus promotores el dominio PDS (*Post Diauxic Shift*) (T(A/T)AGGGAT), que presenta una elevada similitud con el motivo STRE reconocido por Msn2/4

(Pedruzzi *et al*, 2000; Roosen *et al*, 2005). Al igual que Msn2/4, Gis1 se une a los promotores de los genes diana a través de dominios con dedos de zinc Cys₂His₂ (Orzechowski-Westholm *et al*, 2012). La actividad de Gis1 está controlada por la ruta cAMP/PKA a través la proteína quinasa Rim15 (de Virgilio *et al*, 2004; Sarkar *et al*, 2014; Bontron *et al*, 2013). En condiciones de inhibición de la ruta cAMP/PKA, Gis1 activa la expresión de los genes necesarios para la supervivencia en la fase postdiáuxica. De hecho, las cepas mutantes *gis1Δ* son defectuosas en la entrada en fase estacionaria (Pedruzzi *et al*, 2000; Orzechowski-Westholm *et al*, 2012). Además, Gis1 actúa también como represor de la expresión de genes implicados en el crecimiento fermentativo (Orzechowski-Westholm *et al*, 2012). Este factor de transcripción presenta en su región N-terminal los dominios histona demetilasa JmjC y JmjN y en su región C-terminal se encuentra la región de unión a las secuencias PDS de los promotores (Quan *et al*, 2011; Orzechowski Westholm *et al*, 2012).

El factor de transcripción Rph1 presenta una similitud de secuencia del 34% con Gis1, presentando ambos dedos de zinc casi idénticos y al igual que Gis1, actúa también como represor de genes durante la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, a diferencia de Gis1, Rph1 está implicado fundamentalmente en la regulación transcripcional de genes con motivos STRE, cuya activación se produce entre el final de la fase postdiáuxica y la fase estacionaria temprana (Jang *et al*, 1999; Orzechowski Westholm *et al*, 2012). Mediante estudios de *microarrays* en cepas silvestres y en mutantes simples delecionados en *GIS1* y en *RPH1* se confirmó la participación de ambos factores de transcripción en la represión, indistintamente, de genes con motivos STRE y PDS implicados en la síntesis de glicerol, de acetato y de metabolitos asociados al envejecimiento durante la fase de crecimiento exponencial. Por el contrario, durante la fase postdiáuxica Gis1 y Rph1 regulan la activación transcripcional de estos mismos genes, participando Gis1 en la activación de genes con motivos PDS y STRE y Rph1 fundamentalmente en la activación de genes con motivos STRE (Orzechowski-Westholm *et al*, 2012). Al igual que Gis1, este factor de transcripción presenta un dominio histona demetilasa JmjC en su región N-terminal (Nordberg *et al*, 2004).

5.2 OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE NUTRIENTES RELACIONADAS CON PKA

Como muestra de la complejidad de la regulación de la respuesta celular a la disponibilidad de nutrientes, además de la ruta cAMP/PKA, participan de forma coordinada otras rutas de señalización (Figura 6).

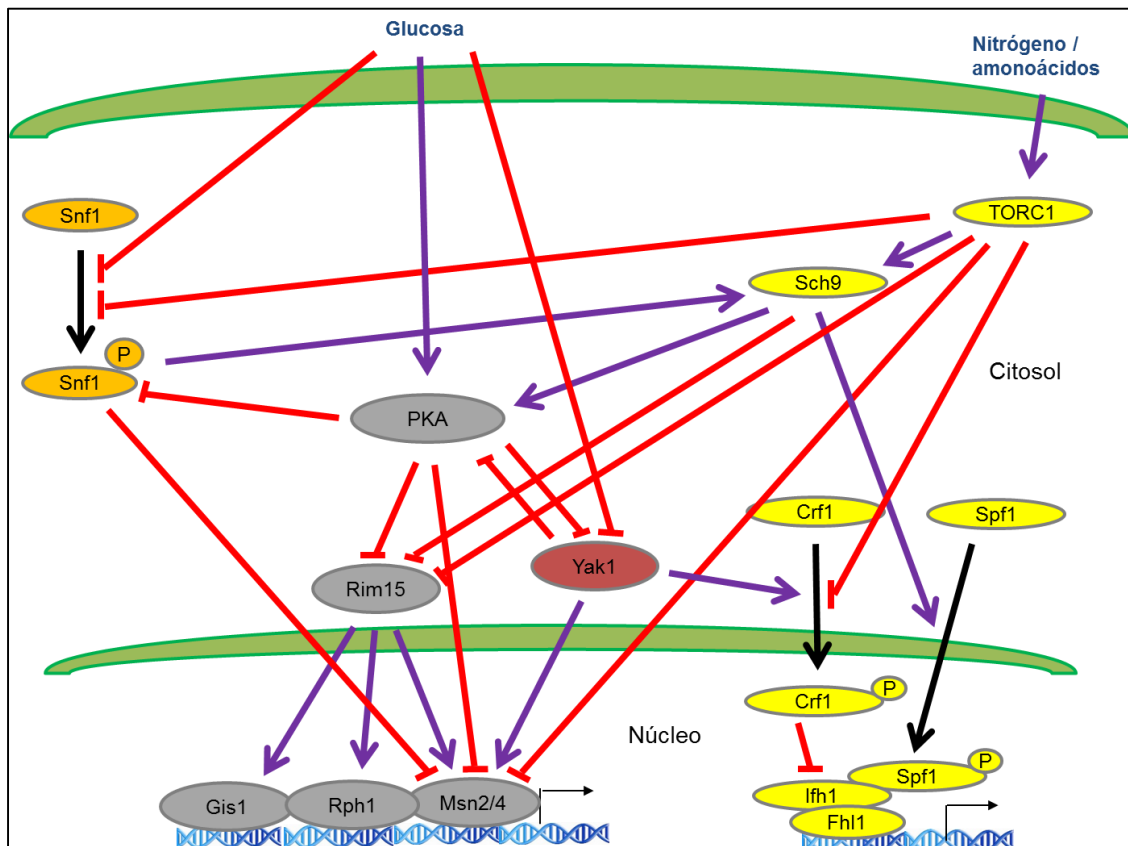


FIGURA 6. Esquema de las rutas implicadas en la señalización de nutrientes en *Saccharomyces cerevisiae*. Las líneas azules indican efecto activador, las rojas efecto inhibidor, y las negras indican conversión de forma inactiva en forma activa del sustrato correspondiente.

La ruta TOR (*Target of Rapamycin*), ampliamente conservada tanto funcional como estructuralmente a nivel eucariótico, desempeña funciones relacionadas con el crecimiento celular asociada a procesos dependientes de la disponibilidad de nitrógeno. A diferencia de lo que ocurre en otros eucariotas superiores, en *S. cerevisiae* existen dos proteínas Tor, Tor1 y Tor2 (Helliwell *et al*, 1994), que actúan en dos subconjuntos diferentes de proteínas, los denominados complejos *TORC1* y *TORC2*. El complejo *TORC1*, localizado fundamentalmente en la membrana vacuolar, consta de las proteínas Tor1 o Tor2 asociadas a las proteínas Kog1, Lst8 y Tco89 (Loewith *et al*, 2002; Wedaman *et al*, 2003; Reinke *et al*, 2004). Este complejo es sensible a rapamicina y su inhibición afecta a la

síntesis de proteínas, a la biogénesis de ribosomas, a procesos de transcripción, al ciclo celular, a la meiosis, a la absorción de nutrientes y a la autofagia. El complejo *TORC2* contiene exclusivamente a Tor2 asociada a las subunidades protéicas Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 y Lst8. Este complejo es, a diferencia de *TORC1*, insensible a la rapamicina y está implicado en la organización del citoesqueleto de actina, la endocitosis, la biosíntesis de lípidos y la supervivencia celular (Loewith *et al*, 2002; Wullschleger *et al*, 2005).

TORC1 ejerce su función a través de dos ramas efectoras, la proteína quinasa Sch9 y el complejo Tap42-PP2A (Loewith & Hall, 2011; Broach, 2012). A través de estos dos efectores *TORC1* regula positivamente la biogénesis y la traducción de proteínas ribosomales e inhibe las respuestas a estrés inducidas en células quiescentes y que son incompatibles con el crecimiento (de Virgilio, 2012). En condiciones favorables desde el punto de vista nutricional, *TORC1* activa mediante fosforilación a Sch9 en los residuos de serina y treonina, activando así a esta proteína quinasa (Urban *et al*, 2007), que a su vez activa también por fosforilación a Sfp1, regulador transcripcional de proteínas ribosomales (Martín *et al*, 2004; Lempiainen & Shore, 2009). En ausencia de nitrógeno, así como de glucosa, aminoácidos o fosfato, Sch9 es rápidamente desfosforilada e inactivada, actuando así como elemento coordinador de varias vías de control nutricional. *TORC1* regula a través de Sch9 la traducción protéica y el tamaño celular previo a la división (Jorgensen *et al*, 2004). En estas condiciones de carencia de nutrientes el inhibidor Crf1 compite con el co-activador Ifh1 para la unión a Fhl1, lo que provoca la inactivación de este último, bloqueándose así la expresión de genes ribosomales. *TORC1* en condiciones de activación bloquea la translocación al núcleo de Crf1, bloqueando así su efecto inhibitorio, mientras que la quinasa Yak1, cuyas características se describirán más adelante, favorece su localización nuclear por fosforilación (Figura 6) (Martín *et al*, 2004). El complejo *TORC1* también regula a través de Sch9 la respuesta a estrés y la entrada en fase G0, secuestrando en el citoplasma a la proteína quinasa Rim15 impidiendo así la expresión de los genes regulados por Msn2/4 y Gis1 (Wanke *et al*, 2008; Pedruzzi *et al*, 2003). Además, *TORC1* en su forma activada controla también la localización subcelular de Msn2/4, al cual fosforila y secuestra en el citoplasma en condiciones nutricionales favorables de forma independiente de Sch9 (Mayordomo *et al*, 2002).

Sch9 es una proteína quinasa de la familia AGC cuya activación es dependiente de su fosforilación por *TORC1* en condiciones de disponibilidad de nitrógeno.

Una vez activada, Sch9 induce la expresión de genes relacionados con la biogénesis de ribosomas. La activación de Sch9 está mediada también por las quinasas Pkh1, Pkh2 y Pkh3, activadas a su vez en presencia de esfingolípidos (Jacinto & Lorberg, 2008; Casamayor *et al*, 1999). Otros estudios han determinado que en condiciones de inhibición de *TORC1*, Sch9 participa también en la regulación del control por glucosa actuando sobre PKA, a nivel de la fosforilación de Bcy1. Este efecto sobre la fosforilación de Bcy1 supone por tanto la activación de PKA en condiciones nutricionales en las que el complejo *TORC1* está activo (Soulard *et al*, 2010; Zhang *et al*, 2011; Sundaram *et al*, 2015). De esta forma, Sch9 ejerce de elemento de conexión entre las rutas TOR y cAMP/PKA lo que confiere a esta proteína quinasa un papel integrador entre ambas rutas de señalización de nutrientes. Otros genes regulados negativamente por *TORC1* a través de la vía de Sch9 son los implicados en la función mitocondrial, la homeostasis y la señalización de esfingolípidos (Swinnen *et al*, 2014).

La levadura utiliza glucosa como fuente de carbono de forma preferente. En base a ello, la glucosa induce la represión transcripcional de genes responsables del metabolismo de otras fuentes de carbono. Además, induce la represión de la función mitocondrial, necesaria para el proceso de fosforilación oxidativa implicada en el metabolismo de fuentes de carbono no fermentables. Estos procesos de represión dependientes de la disponibilidad de glucosa están regulados respectivamente por la quinasa Snf1 y por el complejo regulador Hap, implicado en la regulación de la expresión de genes asociados al núcleo y a la mitocondria (Buschlen *et al*, 2003). Así, *SNF1* se identificó como un gen necesario para la represión de los procesos de metabolismo de la glucosa en condiciones de crecimiento con sacarosa como única fuente de carbono y para la inducción de la enzima invertasa. El complejo proteico *SNF1* es miembro de la familia de proteínas eucariotas activadas por AMP (AMPKs). Es un heterotrímero compuesto por la subunidad catalítica Snf1 (α), la subunidad reguladora Snf4 (γ) y una de las tres subunidades β (Gal83, Sip1 o Sip2), que actúan como soporte estabilizador de la proteína y determinan su localización subcelular (Conrad *et al*, 2014). La glucosa regula la fosforilación del dominio de activación de Snf1, de forma que en su presencia, Snf1 se muestra desfosforilada e inactiva. Además, como se mencionaba anteriormente, Snf1 también se activa en condiciones de carencia de nitrógeno que suponen la inhibición del complejo *TORC1*. En estas condiciones se produce la fosforilación del aminoácido Thr210 de Snf4, activándose así la actividad catalítica de Snf1 (Orlova *et al*, 2010). En situaciones de carencia de glucosa el complejo Snf1

fosforila y activa la proteína quinasa Sch9, lo que implica su conexión con las rutas de control nutricional cAMP/PKA y TOR (Zaman *et al*, 2009). Sak1 y Tos3 presentan sitios de fosforilación por PKA, que añadido al hecho según el cual en células que carecen del receptor de glucosa Gpr1 la actividad de Snf1 se ve incrementada indica que la ruta cAMP/PKA ejerce un efecto inactivador del complejo Snf1 (Barret *et al*, 2012). Además, Snf1 regula la distribución subcelular de Msn2/4, manteniendo la localización citoplasmática de este factor de transcripción en condiciones de disponibilidad de glucosa (Mayordomo *et al*, 2002).

Yak1 es otra proteína quinasa implicada en la regulación nutricional. En condiciones de carencia de glucosa o en presencia de rapamicina se muestra activa, localizándose en el núcleo celular. Sin embargo, la presencia de esta fuente de carbono induce su relocalización al citoplasma y su unión a las proteínas citoplasmáticas 14-3-3. La unión de estas proteínas citoplasmáticas a Yak1 es dependiente de su previa fosforilación por PKA, reduciéndose significativamente su actividad quinasa (Moriya *et al*, 2001; Martín *et al*, 2004). A su vez, Yak1 fosforila a Bcy1 en su región N-terminal induciendo así su relocalización citoplasmática y su unión a las subunidades catalíticas de PKA, inhibiendo así la ruta (Griffioen *et al*, 2001). Además, aunque la localización subcelular de Msn2/4 es dependiente de su fosforilación por PKA, Yak1 podría participar en su activación por fosforilación tras la unión de este al DNA, fenómeno ya demostrado para el factor de transcripción de choque térmico Hsf1 (Lee *et al*, 2013). De esta forma, mientras Yak1 inhibe el crecimiento celular y estimula la respuesta a estrés, PKA ejerce el efecto contrario. Yak1 es además un elemento de conexión entre las rutas cAMP/PKA y Tor, ya que activa por fosforilación a Crf1, inhibidor del coactivador transcripcional Irf1 dependiente de TORC1 (Martín *et al*, 2004) (Figura 6).

OBJETIVOS

El objetivo global planteado en la presente tesis doctoral ha sido la caracterización de la regulación transcripcional que se produce en respuesta a la presencia de inhibidores de la β -1,3-glucán sintasa en *Saccharomyces cerevisiae*. Este objetivo se ha desarrollado a través de tres objetivos parciales:

1. Caracterización de la participación de la ruta de integridad celular (CWI) en la regulación de la respuesta transcripcional frente a caspofungina.

1a. Obtención de los perfiles transcripcionales globales en presencia y ausencia del fármaco en los mutantes *slt2 Δ* y *rlm1 Δ* , MAP quinasa y factor de transcripción respectivamente de la ruta CWI.

1b. Validación de los resultados obtenidos mediante el estudio específico de genes representativos de los grupos de respuesta obtenidos.

1c. Análisis bioinformático de los resultados y estudio comparativo con los datos procedentes de otras situaciones de estrés sobre la pared celular.

2. Caracterización del posible papel de otras rutas de señalización celular en la regulación de la respuesta transcripcional frente a caspofungina e identificación de los elementos de estas rutas implicados en la señalización.

3. Estudio de la conexión entre la ruta CWI y las posibles rutas implicadas en la regulación de la respuesta frente a caspofungina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

En el presente trabajo se ha utilizado la colección de cepas mutantes de *Sacharomyces cerevisiae* en el fondo genético BY4741 delecionadas individualmente en cada uno de los ORFs (*Open Reading Frames*) no esenciales identificados en este organismo con la cassette KanMX4, que codifica para la resistencia a la geneticina. Las cepas de levadura utilizadas en este trabajo, así como su genotipo y procedencia, se muestran en la Tabla 1.

Cepa	Genotipo	Procedencia+A1:C13
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>slt2Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>slt2::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>rlm1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>rlm1::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>wsc1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>wsc1::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>rom1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>rom1::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>rom2Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>rom2::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>tus1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>tus1::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>bck1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>bck1::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>mkk1Δ mkk2Δ</i>	Isogénica BY4742; <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 mkk2Δ::kanMX4 mkk1Δ::SpHIS5</i>	Jiménez-Sánchez <i>et al</i> , 2007
<i>msn2Δ msn4Δ</i> (RG001)	Isogénica BY4741; <i>msn2::KanMX4 msn4::HIS3</i>	Bermejo <i>et al</i> , 2008
<i>bcy1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>bcy1::KanMX4</i>	Este trabajo
<i>pde1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>pde1::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>pde2Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>pde2::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>pde1Δ pde2Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>pde1::KanMX4 pde2::HIS3</i>	Este trabajo
<i>rim15Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>rim15::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
<i>ras2Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>ras2::KanMX4</i>	Euroscarf (Alemania)
BAS3	Isogénica BY4741; <i>wsc1::SpHIS5 mid2::MID2exWSC1cyt</i>	Bermejo <i>et al</i> , 2010
BAS4	Isogénica BY4741; <i>mid2::KILEU2 wsc1::WSC1exMID2cyt</i>	Bermejo <i>et al</i> , 2010

TABLA 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

La obtención del mutante *bcy1Δ* y del doble mutante *pde1Δ pde2Δ*, utilizados en este trabajo, se realizó mediante recombinación homóloga aplicando la técnica de PCR *Short Flanking Homology* (SFH) (Wach *et al*, 1997). En el caso del mutante *pde1Δ pde2Δ* se delecionó el gen *PDE2* sobre un fondo genético *pde1Δ*. Las deleciones génicas fueron verificadas por PCR desde colonia. Los

oligonucleótidos utilizados para las verificaciones de las deleciones de cada uno de los genes se muestran en la Tabla 2.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
BCY1-K2:	5' CCGCCGACGATTTTACTTAC 3'
BCY1-K3:	5' GTCGCAGCATAAGTACTCC 3'
PDE1-K2:	5' CGGTTTCACAAATGACTCGC 3'
PDE1-K3:	5' GCTTTAGCCCATTGGTAATCG 3'
PDE2-K2:	5' CTTTGAATCTGCAGGGGTC 3'
PDE2-K3:	5' GTTGAAGGCTTTTGAATCG 3'
K2:	5' CCGTGCGGCCATCAAAATG 3'
K3:	5' GCCCAGATGCGAAGTTAAG 3'

TABLA 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la verificación por PCR desde colonia de las cepas delecionadas. K2 y K3 son complementarios a secuencias presentes en los extremos del módulo de deleción.

1.2 *Escherichia coli*

Para llevar a cabo la amplificación de los plásmidos empleados en este trabajo se ha utilizado la cepa de *E. coli* DH5 α (*SupE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi - 1 relA1*) (Hanahan, 1983). En los experimentos de sobreexpresión de proteínas se empleó la cepa de *E. coli* Rosetta (*F' ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm pRARE (Cam^R)*) derivada de la cepa BL21.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

La preparación de todos los medios de cultivo se realizó utilizando agua desionizada purificada mediante el sistema Millipore. La esterilización de estos medios se realizó por autoclavado a una temperatura de 121°C y 1 atm de sobrepresión durante 20 minutos. Para la obtención de medios sólidos se añadieron 20 g/l de agar a su composición antes de su esterilización.

2.1 MEDIOS DE CULTIVO DE *S. cerevisiae*

Las células de levadura fueron crecidas de forma habitual en medio rico YPD (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l). También se utilizó medio sintético completo SC (1,7 g/l de base nitrogenada para levaduras, 5 g/l de sulfato amonico, 20 g/l de glucosa) suplementado con una mezcla comercial

de aminoácidos (Formedium). Cuando fue necesario llevar a cabo la selección de un marcador auxotrófico, se utilizaron medios sintéticos selectivos (SC-aa), de igual composición que el medio sintético completo (SC) pero suplementados con una mezcla comercial de aminoácidos que carece del aminoácido o los aminoácidos necesarios, dependiendo de las auxotrofías de las cepas. Los productos para la fabricación de los medios fueron suministrados por Panreac, Duchefa, Pronadisa, Sigma y Merck. Para la selección de cepas que portasen el marcador de KanMX4, el medio YPD fue suplementado con 200 mg/l de geneticina (Gibco).

2.2 MEDIOS DE CULTIVO DE *E. coli*

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio LB (Luria-Bertani) cuya composición es 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5-10 g/l de cloruro sódico. Este medio se suplementó con ampicilina (Britapen, G.S.K.) a una concentración de 100 µg/ml cuando fue necesario seleccionar células bacterianas transformadas con plásmidos incluyendo el gen de resistencia para este antibiótico como marcador de selección.

2.3 CONDICIONES DE CULTIVO Y DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO

En la mayoría de los experimentos realizados se procedió inoculando el medio de cultivo líquido YPD con las cepas a estudiar, creciéndolas con agitación (180 - 220 rpm) a 24°C durante toda la noche, de tal manera que al día siguiente la D.O._{600nm} del cultivo no superara el valor de 1. Al día siguiente, los cultivos se refrescaron a una D.O. de 0,2 en medio YPD y se incubaron durante 2 horas más a 24°C. Posteriormente, el cultivo se dividió en dos partes iguales, añadiendo a uno de ellos la droga o tratamiento a ensayar, mientras que el otro actuaba como cultivo control sin tratamiento, siendo ese momento el tiempo cero del experimento. Los cultivos se incubaron seguidamente durante el tiempo indicado para cada tipo de experimento, transcurrido el cual las células eran recogidas mediante centrifugación a 2.500 rpm a 4°C.

Los compuestos utilizados y los tratamientos realizados en este trabajo han sido los siguientes:

- Caspofungina: Fármaco suministrado por Merck Sharp and Dohme (MSD), Research Laboratories, EEUU. Inhibe la síntesis de β 1,3-glucano de la pared celular. Esta droga se utilizó a una concentración final de 15 ng/ml para todos

los estudios realizados en medio líquido. Se añade al medio de cultivo a partir de una solución madre preparada en DMSO puro y almacenada a -80°C.

- Aminocandina: Fármaco suministrado por Indevus Pharmaceuticals, EEUU. Su mecanismo de acción, así como su almacenamiento y utilización en este trabajo son iguales a los de la caspofungina.
- Blanco de Calcofluor (CFW): *Fluorescent Brightener 28*, Sigma-Aldrich, EEUU. Tiene afinidad por la quitina, alterando de esta manera la estructura de la pared celular. Se ha utilizado a una concentración final de 5 µg/ml.
- Ausencia de glucosa: Para el estudio de la respuesta a la ausencia de glucosa en el medio, los cultivos creciendo en medio líquido YPD fueron lavados dos veces por centrifugación (2500 r.p.m) utilizando medio líquido mínimo sin glucosa (SC-Glu), siendo finalmente resuspendidas las células en este mismo medio e incubadas durante 2 horas en agitación a 24°C.

En el caso de *E. coli*, la temperatura de crecimiento fue de 37°C tanto en medio líquido como en medio sólido, aplicando agitación a una velocidad 220 rpm en el caso del crecimiento en medio líquido.

La determinación del crecimiento tanto de la levadura como de *E. coli* se realizó mediante turbidimetría, midiendo la densidad óptica (D.O.) en un espectrofotómetro Beckman DU640. En el caso de *S. cerevisiae* la lectura se realizó a 600 nm, mientras que en el caso de *E. coli* se realizó a 550 nm.

3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

3.1 EXTRACCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE DNA

Para la extracción y purificación de DNA plasmídico procedente de *E. coli* se utilizaron sistemas comerciales de la casa Roche (*High Pure Plasmid Isolation Kit*) para la extracción a escala pequeña. El proceso de restricción de DNA, así como la preparación de geles de agarosa en tampón TAE (4mM Tris Acetato, 1mM EDTA), teñidos posteriormente con una solución del agente intercalante Gel-Red y observados en un transiluminador de luz UV MiniLumi (DNR *Bio-imaging systems*), se realizó siguiendo los protocolos convencionales de laboratorio (Ausubel *et al*, 1993; Sambrook *et al*, 1989). Las enzimas de restricción empleadas, la DNA ligasa y la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) fueron adquiridas a *Roche Diagnostics*. Para la elución del DNA

a partir de geles de agarosa se utilizó el kit comercial *Gene Clean Turbo™ Kit* (MP Biomedicals).

La determinación de la concentración de DNA presente en las muestras se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm de una dilución 1:200 de las mismas en un espectrofotómetro Beckman DV 640 (1 unidad de densidad óptica corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de DNA). Cuando fue necesario, la secuenciación de DNA extraído se realizó en la Unidad de Genómica de la UCM utilizando equipos de secuenciación automática multicapilar.

3.2 PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo, así como sus características principales y su procedencia, se muestran en la Tabla 3.

Plásmido	Características	Procedencia
pADH1-MSN2-GFP	Fusión de <i>MSN2</i> a <i>GFP</i> bajo control del promotor del gen <i>ADH1</i> , clonado en el vector pRS316	Görner <i>et al</i> , 1998
pRS423-pr ^{CUP} -6xMYC- <i>cki1</i> ^{2-200(S125/130A)}	Fusión a <i>MYC</i> de una versión de <i>CKI1</i> modificada en sus sitios de fosforilación por Pkc1, incluida en el vector pRS423	Graef & Nunnari, 2001
pTS118	Contiene el alelo constitutivamente activado de <i>RAS2</i> (<i>RAS2</i> ^{Val19}) clonado en el vector YCplac33	Schmelzle <i>et al</i> , 2003
pGEX2T-RBD	Vector de expresión en <i>E. coli</i> que expresa la secuencia del dominio de alta afinidad a Ras2 RBD de la proteína Raf1.	Cedido por el Dr. Wittinghofer (Instituto Max Planck, Dortmund, Alemania)
pPHY3362	Construcción que contiene la fusión Myc1-Pat1 bajo el promotor de <i>PAT1</i> , clonado en el vector pRS413.	Ramachandran <i>et al</i> , 2011
pHI-U	Contiene una variante de la proteína GFP sensible a variaciones de pH (pHluorina) bajo control del promotor del gen <i>ADH1</i> clonado en el vector pVT100U (marcador <i>URA3</i>)	Maresova <i>et al</i> , 2010

TABLA 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

3.3 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

La transformación bacteriana se realizó según el método de Hanahan (Hanahan, 1983). Para ello, se descongelaron 100 µl de células competentes de la cepa DH5α de *E. coli* sobre las que se añadió 1 µl de DNA plasmídico a una concentración de 0,1-0,5 mg/ml. Se incubaron 35 minutos en hielo, agitándose de forma periódica, seguido de un choque térmico a 42°C de 2 minutos. Posteriormente se dejaron las células un minuto en hielo, se añadieron 420 µl de medio LB líquido y se incubaron durante una hora a 37°C en agitación. Por último, dicha suspensión se plaqueó en medio sólido LB suplementado con ampicilina, incubando las placas durante 24 horas a 37°C.

3.4 TRANSFORMACIÓN EN LEVADURA

La transformación de plásmidos en *S. cerevisiae* se realizó siguiendo el método del acetato de litio (Ito *et al*, 1983). Se partió de 10 ml de cultivo en fase exponencial en medio YPD ($DO_{600nm} = 0,8$). Se recogieron las células en condiciones de esterilidad por centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 µl de una mezcla de 100 µl acetato de litio 1N y 400 µl de polietilenglicol al 40%. A continuación se añadió a la mezcla 50 µg de DNA motocatenario (ssDNA) procedente de esperma de salmón y hervido previamente y 0,1-0,5 µg de DNA a transformar concentrado en 10-20 µl de volumen. La mezcla fue incubada 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se sometió a choque térmico de 42°C durante 20 minutos. Finalmente se plaquearon las células en medio selectivo sólido y se incubaron a 30°C durante 48-72 horas.

4. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE MICROARRAYS DE DNA

Para la realización de los análisis de expresión génica global se utilizaron microarrays de DNA Gene Chip® Yeast Genome 2.0 de la casa Affymetrix (Santa Clara, CA, EEUU). El marcaje de los RNAs problema, la hibridación de los microarrays y análisis de las imágenes y resultados obtenidos se realizó en la Unidad de Genómica de la UCM. A continuación se detallan los aspectos metodológicos más relevantes de las fases clave de esta tecnología.

4.1 EXTRACCIÓN DEL RNA

Las células de *S. cerevisiae* fueron cultivadas y procesadas como se describe en el apartado 2.3. El volumen de cultivo recogido fue de 5 ml (5×10^7 células aproximadamente), y posteriormente centrifugado a 2.600 rpm a una temperatura de 4°C durante 3 minutos. Las células fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido después de retirar el sobrenadante. La extracción del RNA se realizó utilizando el “RNeasy Mini Kit 250” (QIAGEN), mediante el procedimiento de rotura mecánica descrito en las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA extraído se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm.

4.2 SÍNTESIS, MARCAJE E HIBRIDACIÓN DEL cDNA

A partir de 5 µg de RNA total se sintetizó el cDNA de doble cadena por retrotranscripción usando el kit “One - cycle cDNA Synthesis Kit” (Affymetrix, Santa Clara, CA, EEUU). Posteriormente, este cDNA se purificó utilizando el “GeneChip Sample Cleanup Module” (Affymetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se usó como molde para la transcripción *in vitro* y obtener así el cRNA marcado con biotina utilizando el “GeneChip IVT Labeling Kit”. Por último, se llevó a cabo la fragmentación química del cRNA marcado con biotina siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniéndose fragmentos de unos 100 nucleótidos. La concentración de RNA marcado obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop) y su calidad y perfil de tamaños se evaluó por cromatografía capilar en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

Se emplearon 15 µg del cRNA marcado en el cóctel de hibridación para cada microarray procediéndose a la hibridación durante 16 horas a 45°C. Una vez hibridados fueron procesados en la plataforma de fluidos “GeneChip® Fluidics Station 450”. El cRNA hibridado fue identificado mediante un conjugado estreptavidina-ficoeritrina. Las señales de fluorescencia fueron recogidas utilizando el escáner GeneChip® 3000.

4.3 ANÁLISIS DE IMÁGENES, PROCESAMIENTO DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para obtener el perfil transcripcional tanto en presencia como en ausencia de caspofungina se realizaron tres experimentos diferentes, correspondientes a tres muestras biológicas independientes. Los cambios en la expresión génica entre ambas condiciones fueron calculadas como el ratio entre la media de las señales de expresión génica de las muestras tratadas frente a las no tratadas. Los genes fueron considerados como inducidos o reprimidos cuando su ratio de expresión bajo las condiciones analizadas fue ≥ 2 o $\leq 0,5$, respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Cyber-t (<http://cybert.microarray.ics.uci.edu/>) (Baldi & Long, 2001). Aquellos valores con un p-value bayesiano $< 0,01$ fueron considerados como significativos y los genes correspondientes se consideraron para su posterior análisis.

Con el objetivo de determinar si la inducción génica observada en la cepa silvestre (WT) tras el tratamiento con caspofungina se encontraba bloqueada en los mutantes *slt2Δ*, *rlm1Δ* y *msn2/4Δ* se utilizó la relación entre las respuestas de la cepa mutante versus la presentada por la cepa WT. Un valor del ratio mutante/ratio WT $\leq 0,65$ fue considerado como umbral para definir una reducción significativa en la inducción génica, de acuerdo con criterios previamente establecidos en nuestro grupo de investigación (Garcia *et al*, 2009). En todo caso, aquellos genes cuyo ratio de expresión fuera $< 1,65$ fueron considerados como no inducidos en las condiciones de estudio.

El análisis del agrupamiento de genes por sus perfiles de expresión se realizó utilizando MeV (Multiexperiment viewer), versión 4.6 de TIGR (<http://www.tigr.org/software/>).

5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA (qPCR)

Una vez crecidas y tratadas las células se recogieron por centrifugación 7,5 ml de medio de cultivo ($7,5 \times 10^7$ células aproximadamente). El sobrenadante fue desechado y las células fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido. El RNA fue extraído como se describe en el apartado el apartado 4.1. La síntesis de cDNA se realizó con el kit “Takara Biotechnology” empleando 2 μ g de RNA

total. El cDNA obtenido fue diluido 100 veces en agua mili-Q. Las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado en placas multipocillo–384, incluyendo 4,5 µl de cDNA problema, 5 µl de Power SYBR Green PCR Master MIX (Applied Biosystems) y 0,6 µl de cada oligonucleótido a concentración 5 µM. Las parejas de oligonucleótidos correspondientes se diseñaron en el extremo 3' de los genes en estudio, con ayuda del programa bioinformático Primer Express (Tabla 4). La qPCR se realizó en el equipo Applied Biosystems 7900HT y las condiciones de reacción fueron las siguientes: un ciclo de 10' a 95°C seguido de 40 ciclos de 15'' a 95°C y 1' a 60°C. La expresión de cada gen en estudio fue normalizada relativizando los valores según la expresión del gen control *ACT1* y los ratios de variación de la expresión (tratamiento versus no tratamiento) fueron obtenidos siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak y Schmittgen (2001).

La Tabla 4 incluye la relación de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de qPCR.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
<i>MLP1</i>	MLP1_UP	TGAATTATCAATGCACAAAAGG
	MLP1_RP	TGAATTATCAATGCACAAAAGG
<i>AFR1</i>	AFR1_F	GCCTGCCAGATTCTCATTTTGA
	AFR1_R	CCGGACATCTTTTTTTATTGGTTT
<i>PRM5</i>	PRM5_F	ACGATTACGCTACCATCACTTTCT
	PRM5_R	AGACATAAGGAAACCCGCAAAAA
<i>ALD3</i>	ALD3_F	CACATGTTTGCTCGCATATTAA
	ALD3_R	GCTTCTTCTGATTGGTTTCATTG
<i>CTT1</i>	CTT1_F	TCAAAAATGAAGACAACGACGAA
	CTT1_R	ACAATATGCTCGTTTCTGATTGG
<i>HXT5</i>	HXT5_F	CCCCGTTGCCTATGTCCTTA
	HXT5_R	CGACATTGCTTTACCACGTACTCT
<i>ALD4</i>	ALD4_F	GCGGGTACGGTCTGGATAAA
	ALD4_R	ACCCACCGAAAGGAACTGC
<i>ARO10</i>	ARO10_F	CGACGTTATGTCTTGAAATGG
	ARO10_R	CTTCCGTCGAAAGTCTCCGA
<i>ATG8</i>	ATG8_F	ATCAACGCCGAGTAGGTG
	ATG8_R	CCCCCTGAGAAGGCCATCT
<i>NQM1</i>	NQM1_F	TCTGTAGCCATTTGATCTTCGTTT
	NQM1_R	CTTTTATCAACGACGAGCCTCA
<i>ACT1</i>	ACT_F	ACGAAAGATTCAGAGCCCCA
	ACT_R	CCAGATTCCAAACCCAAAACA

TABLA 4. Oligonucleótidos utilizados en ensayos de RT-qPCR.

6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE *WESTERN-BLOT* Y ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN

6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se recogieron los correspondientes volúmenes de cultivo requeridos para cada experimento, especificados más adelante, en tubos Falcon, donde previamente se había añadido un volumen de hielo similar. Se centrifugaron a 4°C y 2.600 rpm durante 3 minutos y, tras eliminar el sobrenadante, las células se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Cada muestra de células fue resuspendido en 250 µl del tampón de lisis de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, 1% Tritón X100, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 50 mM β-glicerol fosfato, 5 mM pirofosfato sódico y 1 mM de ortovanadato sódico). Este tampón fue suplementado en el momento de uso con inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free, *Protease inhibitor cocktail tablets*, de la casa comercial Roche), que se usa a una concentración de una pastilla por cada 10 ml de tampón de lisis. Por último, se añadió PMSF a una concentración final de 1 mM. Las suspensiones celulares se transfirieron a tubos eppendorf y se añadieron bolitas de vidrio de 1 mm de diámetro (Glasperlen, Germany) hasta la mitad del volumen de la suspensión. Las células se rompieron por agitación en Fastprep (Fastprep-24, MP Biomedicals), aplicando dos pulsos de 30 segundos a fuerza 5,5, depositando las suspensiones en hielo entre pulso y pulso, y centrifugando inmediatamente después de la rotura a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C con el objetivo de recuperar los sobrenadantes. La concentración aproximada de proteína total en los extractos, se calculó midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Una unidad de densidad óptica corresponde aproximadamente a 1 mg/ml de proteína. A partir de cada extracto, se preparó un volumen de 50 µl ajustado con agua destilada, con una concentración de proteína total de 30 µg/µl. A continuación, se añadieron 50 µl de tampón de carga SDS-PAGE 2X (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% SDS, 25% glicerol, 0,6 g de azul de bromofenol, al que se añade en el momento de uso DTT a una concentración final de 200 mM) o 12,5 µl de 5x [40 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% azul de bromofenol, 10% SDS, 33% glicerol y 20% de β-mercaptoetanol (β-ME)]. Por último, las preparaciones fueron hervidas durante 5 minutos para su desnaturalización.

6.2 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Para la separación electroforética de las proteínas de los extractos celulares obtenidos se utilizó el soporte SDS-PAGE, usando geles de poliacrilamida a una concentración del 10%. El gel separador al 10% consta de: Acrilamida 30% (1,98 ml), Bis-acrilamida 2% (0,8 ml), Tris-HCl 1 M pH 8,8 (2,25 ml), H₂O (0,87 ml), SDS 10% (60 µl), PSA (Persulfato amónico) 10% (30 µl) y TEMED (Tetrametiletilenediamina) (8 µl). El gel concentrador consta de: Acrilamida 30% (0,325 ml), Bis-acrilamida 2% (0,135 ml), Tris-HCl 1 M pH 6,8 (0,25 ml), H₂O (1,25 ml), SDS 10% (20 µl), PSA 10% (20 µl) y TEMED (2 µl).

La electroforesis se realizó en cubetas Mini Protean III (Bio-Rad) a un voltaje entre 150-200 V. La composición del tampón de electroforesis fue de 196 mM glicina, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,3. El patrón de pesos moleculares utilizado fue *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad).

6.3 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Las proteínas separadas durante la electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham) de un tamaño aproximado de 5x8 cm. Se utilizaron cubetas de transferencia en húmedo Mini Trans - Blot Transfer Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 60 min. Para fabricar el tampón de transferencia se mezcló un volumen del tampón de transferencia concentrado 10X (58 g/l Tris-HCl, 29 g/l de glicina, 3,7 g/l de SDS) con dos volúmenes de metanol y siete volúmenes de agua destilada.

6.4 INMUNODETECCIÓN

Tras la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche desnatada al 5% en TTBS (29,2 g/l de NaCl, 24,2 g/l de Tris pH 7,5 y 500 µl de Tween 20) durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario, preparado a la concentración adecuada siguiendo la información aportada por cada fabricante, en una mezcla de TTBS-leche al 5% durante 90 minutos a 4°C. A continuación, se llevaron a cabo entre 3 y 6 lavados a intervalos de 10 minutos con TTBS a temperatura ambiente y se incubó la membrana con el anticuerpo

secundario correspondiente, conjugado a un fluorocromo (*LI-COR*) diluido en TTBS-leche al 5% durante 45 minutos manteniéndose en oscuridad. Por último, se realizaron al menos 3 lavados con TTBS en agitación, en oscuridad y a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 5.

Anticuerpo	Características	Procedencia
Anti-fosfo p42/44 MAPK (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technology (N°Cat 4377)
Anti-G6FDH	Monoclonal de conejo	Sigma (N°Cat A9591)
Anti-Ras2 (yC-19)	Policlonal de cabra	Santa Cruz (N°Cat 6759)
Anti-c-Myc	Monoclonal de ratón	BioLegend (N°Cat 626801)
Anti-Phospho-PKA substrate	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology (N°Cat 9624)
IRDye 800CW Anti-conejo	Policlonal de cabra	LICOR (N°Cat 926-32211)
IRDye 680LT / Anti-conejo	Policlonal de cabra	LICOR (N°Cat 926-68021)
IRDye 800CW / Anti-cabra	Policlonal de burro	LICOR (N°Cat 926-32214)
IRDye 680LT / Anti-ratón	Policlonal de cabra	LICOR (N°Cat 926-68020)
ECL / Anti-conejo IgG	Policlonal de burro	GE Healthcare (N°Cat NA934)
ECL / Anti-conejo IgG	Policlonal de oveja	GE Healthcare (N°Cat NA931)

TABLA 5. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

Para el revelado de las membranas estas se escanearon con el escáner *Odyssey* (*LI-COR*). Para determinar la intensidad de señal de las bandas, se utilizó el software Image Studio Lite 5.0 de *LI-COR Biosciences*.

Estudio de la fosforilación de Slt2

A partir de los extractos celulares obtenidos de 10 ml de cultivo (equivalente a 10^8 células) se estudió la fosforilación de la MAP quinasa Slt2 utilizando el anticuerpo primario policlonal anti-fosfo p42/44 MAPK, que reconoce únicamente la forma fosforilada de esta MAPK. Para detectar este anticuerpo se utilizó el anticuerpo secundario anti-conejo IRDye 800CW. Como control de carga de proteína se utilizó el anticuerpo primario anti-G6FGDH, siendo este posteriormente detectado mediante el anticuerpo secundario anti-conejo YRDye 680LT.

Estudio de la fosforilación de Cki1 y Pat1

Para el estudio de fosforilación dependiente de PKA de la proteína Cki1 se analizaron extractos proteicos procedentes de la cepa silvestre y el mutante *wsc1Δ* transformadas con el plásmido pRS423-pr^{CUP}-6xMYC-*cki1*^{12-200(S125/130A)}, que contiene una versión de esta proteína correspondiente a sus 200 primeros aminoácidos fusionada al epítipo Myc, incluyendo mutaciones en dos sitios de fosforilación por la proteína quinasa C (S125A y S130A), lo que la convierte en diana exclusiva de PKA (Deminoff *et al*, 2006; Ha *et al*, 2014). Para este experimento se recogieron 40 ml de medio de cultivo (equivalente a 4×10^8 células). La fusión Myc-Cki1 se detectó utilizando el anticuerpo anti-c-Myc. La detección del anticuerpo anti-c-Myc se realizó utilizando el anticuerpo anti-ratón IRDye 680LT. La menor movilidad electroforética de la forma fosforilada de Myc1-Ck1 con respecto a la forma no fosforilada permitió cuantificar la proporción entre ambas formas de esta proteína.

En la monitorización del nivel de fosforilación de Pat1 por PKA se recogieron volúmenes de 10 ml de cultivo tratado a diferentes tiempos con caspofungina (30, 60, 90 y 120 minutos), así como en ausencia de caspofungina tras 120 minutos. Una muestra procedente del cultivo durante una hora en ausencia de glucosa se empleó como condición control de inhibición de PKA. Se utilizaron células transformadas con el plásmido *PAT1*pro-Myc-Pat1 que expresan la fusión de Pat1 a Myc bajo control del promotor de *PAT1* nativo. Tras la rotura celular y la obtención de extractos proteicos utilizando tampón de lisis carente de Triton X-100 y SDS, Myc-Pat1 fue inmunoprecipitada con el anticuerpo monoclonal anti-c-Myc a 4°C durante 16 horas. A continuación la muestra fue transferida a la resina rProtein A Sepharose Fast Flow (17-1279-01; GE Healthcare Life Science) durante 90 minutos a 4°C. Posteriormente, tras varios lavados con tampón de lisis la muestra se hirvió tras añadir tampón de carga 5X

y se evaluó el nivel de fosforilación por PKA en el material inmunoprecipitado utilizando un anticuerpo primario que reconoce sitios de fosforilación por PKA (*anti-Phospho-PKA*). Para la detección de este anticuerpo se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo. Los niveles totales de Myc1-Pat1 se evaluaron utilizando el anticuerpo anti-c-Myc. En este caso particular se emplearon anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Para el revelado de las membranas se utilizó el sistema de detección quimioluminiscente ECL y películas Hyperfilm™ MP (Amersham-Biosciences). El revelado de las películas se realizó de forma manual.

7. DETERMINACIÓN *IN VIVO* DEL *RATIO* Ras2-GTP / Ras2 TOTAL

La determinación del nivel de Ras2-GTP se realizó mediante la técnica de *pull-down* gracias a su afinidad por el dominio RBD (*Ras binding-domain*) siguiendo como base el protocolo descrito por Li y Wang (2013). Se ha utilizado el dominio RBD de la proteína humana Raf1, localizado entre los aminoácidos 1 y 149, fusionado a GST, de forma que Ras2-GTP se une a este dominio con una afinidad 1000 veces superior a la que muestra Ras-GDP. La fusión RBD-GST se obtuvo a partir de células de *E. coli* Rosetta expresando el plásmido pGEX2T-RBD. Tras 16 horas de crecimiento en medio líquido LB suplementado con ampicilina a 37°C en agitación, el cultivo se refrescó hasta una D.O._{550nm} de 0,1 en un volumen final de 200 ml de LB y se dejó crecer una hora más a la misma temperatura. A continuación se añadieron 20 µl de IPTG 1M para inducir la producción de RBD-GST, incubando 4 horas en agitación a 30°C. Posteriormente se recogieron las células por centrifugación a 3.000 rpm en frío (4°C) y se resuspendieron en 10 ml de tampón A (Tris-HCl 25mM (pH 7,4), NaCl 140mM, Triton X-100 0,1% y PMSF 1mM), a los que se añadieron 10 µl de lisozima (100 mg/ml) para favorecer la rotura de las células bacterianas. Tras 10 minutos de incubación en hielo con esta enzima, las células fueron sometidas a 10 ciclos de sonicación, 10 segundos por ciclo, a potencia 4 (*Sonics Materials Vibra Cell™*), para su rotura. Por último, las muestras fueron centrifugadas a 20.000 rpm a 4°C durante 30 minutos, recogiendo a continuación los 10 ml de sobrenadante, que contienen la fusión RBD-GST. Este sobrenadante fue incubado durante 2 horas a 4°C en agitación con 500 µl de resina *Glutathione S-Transferase* (GST), previamente lavada y resuspendida de nuevo en 500 µl de tampón A. Finalmente, las muestras se lavaron 5 veces mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 1 minuto a 4°C y posteriormente se resuspendió la resina

en 500 μ l de tampón de lavado (Tris-HCl 25mM (pH7,4), NaCl 500mM, Triton X-100 0,1% y PMSF 1mM).

Por otro lado, tras el cultivo de la cepa silvestre en presencia o ausencia de caspofungina o en medio carente de glucosa (SC-Glu), como control de inactivación de Ras2, así como de la cepa mutante *ras2* Δ , se recogieron 30 ml de cultivo (equivalente a 3×10^8 células) mediante centrifugación a 3.000 rpm a 4°C, realizando dos lavados con 1 ml de tampón de lavado y siendo finalmente resuspendidas las células en 1 ml de tampón B (Tris-HCl 50mM (pH7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, MgCl 25 mM, Nonidet P-40 0,1%, deoxicolato sódico 0,25%, PMSF 1mM, NaF 10 mM, ortovanadato sódico 1 mM, β -glicerol fosfato 10 mM) para su rotura. Tras la rotura de las células, siguiendo la metodología indicada en el subapartado 6.1, se ajustó el extracto proteico a 1,5 mg de proteína en un volumen de 500 μ l de tampón B, al que se añadieron una pastilla de cocktail de inhibidores de proteasas, y 80 μ l de resina unida a RBD-GST. Tras 4 horas de incubación a 4°C se realizaron 3 lavados con 1 ml de tampón B a 1.000 rpm a 4°C, resuspendiendo finalmente las muestras en 25 μ l de tampón de carga 2X e hirviéndolas durante 5 minutos.

8. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para los estudios de localización subcelular de Msn2-GFP se utilizaron células de levadura transformadas con el plásmido *pADH1-MSN2-GFP*, que expresa una fusión de Msn2 a GFP bajo control del promotor *ADH1*. Las células en fase exponencial procedentes de cultivos en medio YPD se observaron directamente mediante microscopía de fluorescencia y contraste por interferencia diferencial (DIC) usando un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U equipado con CCD. La observación se realizó acondicionando el espacio habilitado para la microscopía a una temperatura de 24°C, con la finalidad de evitar variaciones debidas al cambio de temperatura. Las imágenes digitales se adquirieron con una cámara Orca C4742-95-12ER (Hamamatsu Photonics, Japón) acoplada al microscopio y se procesaron con el software de imágenes Hamamatsu HImage. Para la observación de núcleos se añadió a los cultivos 10 μ g/ml de diclorhidrato de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma), 10 minutos antes de la observación al microscopio.

9. CUANTIFICACIÓN DE AMPc INTRACELULAR

Para determinar los niveles intracelulares de AMP cíclico se utilizó el sistema de inmunoensayo enzimático de AMPc de GE Healthcare Life Sciences (RPN2251), basado en un método analítico competitivo. Para cada condición experimental ensayada se recogieron 30 ml de cultivo crecido en fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación a 2.500 rpm a 4°C durante 3 minutos y las células recogidas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Para comenzar con el ensayo, las células se descongelaron en hielo y se lavaron con 1 ml de PBS frío antes de determinar el peso húmedo de cada una de las muestras. Las células se resuspendieron posteriormente en 350 µl de reactivo de lisis 2B, incluido en el kit, y se añadieron 150 µl de perlas de vidrio previamente esterilizadas. Con la finalidad de romper las células, cada suspensión se sometió a un ciclo de vórtex durante 30 minutos a 4°C, centrifugando inmediatamente después a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C. Finalmente se usaron 100 µl de sobrenadante para medir las concentraciones de AMPc intracelular usando el protocolo sin acetilación descrito en el kit.

De esta forma, en primer lugar se añadieron por duplicado 100 µl de muestra problema sobre los pocillos correspondientes, señalados con la letra M (muestra). Paralelamente, se añadieron también por duplicado 100 µl de cada una de las soluciones con concentraciones conocidas de AMPc para la fabricación de la curva de calibración. Estas soluciones fueron preparadas previamente mediante diluciones seriadas partiendo de 3200 fmol de AMPc contenido en 500 µl de reactivo de lisis 1B, disponiendo así de pocillos con cantidades de 1600, 800, 400, 200, 100, 50 y 25 fmol de AMPc. Sobre la pareja de pocillos identificada como 0 se añadió 100 µl de reactivo de lisis 1B. Además, sobre dos pocillos marcados como NSB (*non-specific binding*) se añadieron 100 µl de reactivo de lisis 1B y 100 µl de reactivo de lisis 2B. Posteriormente, tras añadir sobre todos los pocillos, a excepción de los marcados como NSB, 100 µl de la solución que contenía el anticuerpo anti-AMPc, la placa fue incubada a 4°C durante dos horas. A continuación se añadieron sobre cada uno de los pocillos 50 µl de peroxidasa conjugada con AMPc, incubando después la microplaca a 4°C durante 60 minutos. Tras este segundo periodo de incubación, todo el volumen contenido en los pocillos fue eliminado y estos fueron lavados 4 veces con 400 µl de tampón de lavado incluido en el kit. Inmediatamente después se añadieron 150 µl de sustrato TMB, incubando la microplaca a 24°C en leve agitación durante 60 minutos. Por último, se añadieron sobre todos los pocillos

100 μ l de H₂SO₄ 1M para detener la reacción de la peroxidasa, virando de azul a amarillo el color de las soluciones, y leyendo la D.O. de cada uno de los pocillos a una longitud de onda de 450 nm utilizando el lector de placas multipocillo BIO-RAD (Model 680). Dos pocillos vacíos (B) se utilizaron para obtener el valor del blanco. A partir de la D.O. obtenida para cada pocillo se obtuvo el valor %B / B₀ a través de la siguiente relación:

$$\%B / B_0 = \frac{(D.O. \text{ muestra o curva} - D.O. \text{ NSB})}{D.O. 0 - D.O. \text{ NSB}} \times 100$$

Así, a partir del dato %B / B₀ obtenido para los pocillos con concentraciones de AMPc conocidas, se creó una curva de calibrado que fue utilizada para extrapolar el valor %B / B₀ obtenido para cada muestra problema y calcular así la cantidad de AMP cíclico por peso húmedo.

10. DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO INTRACELULAR

Con la finalidad de determinar de forma indirecta la acumulación intracelular de glucógeno básicamente se siguió el protocolo descrito por Petkova *et al*, 2010. Así, se recogieron mediante centrifugación a 2500 r.p.m a temperatura ambiente 30 ml de los cultivos de cada una de las condiciones y cepas a estudiar. A continuación, las células fueron resuspendidas en 1 ml de una solución de yodo 0,2% / yoduro de potasio 0,4% e incubadas a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente estas células fueron centrifugadas de nuevo y finalmente resuspendidas en 30 μ l de la misma solución de I₂ / KI. Esta suspensión fue depositada en forma de gota en placas de agar y fotografiadas inmediatamente. Las imágenes obtenidas se procesaron con Adobe Photoshop CS6. El color marrón oscuro es indicativo de una mayor acumulación intracelular de glucógeno.

11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA A CASPOFUNGINA

A partir de células en fase exponencial de crecimiento se prepararon suspensiones celulares en agua estéril a una D.O.₆₀₀ = 0,13 (aproximadamente 2x10⁶ células / ml). En paralelo se prepararon placas multipocillo con diluciones seriadas 1:2 de caspofungina en 95 μ l de YPD desde 1 μ g/ml hasta 1 ng/ml

incluyendo un control sin fármaco. Finalmente se añadieron 5 μ l de las suspensiones celulares a cada pocillo. Las placas fueron incubadas 48 horas a 30°C, tras lo cual se procedió a cuantificar el crecimiento midiendo la D.O. a 550 nm en los diferentes pocillos utilizando el lector de placas multipocillo BIO-RAD (Model 680).

12. MEDIDA DEL pH CITOSÓLICO

El estudio del efecto de la caspofungina sobre el pH citosólico se realizó utilizando cepas transformadas con el plásmido pHl-U, que expresa la proteína pHluorina, una variante de la GFP cuya emisión de fluorescencia depende del pH. El procedimiento realizado se basa en los protocolos descritos por Brett *et al* (2005) y Maresova *et al* (2010).

Se parte de 30 ml de cultivo en fase exponencial crecido en YPD en presencia o ausencia de caspofungina, Blanco de Calcofluor durante dos horas o transferidos a medio carente de glucosa durante dos horas. A continuación, las células fueron recogidas por centrifugación durante 3 minutos a 2.500 rpm a temperatura ambiente, lavadas dos veces con PBS y finalmente resuspendidas en un volumen de 500 μ l de tampón citrato-fosfato pH 6 a una D.O._{600nm} de 1,5. En paralelo se preparó la curva de calibración, para lo cual, siguiendo el mismo procedimiento, células de la cepa silvestre portando el plásmido pHl-U crecidas en ausencia de caspofungina fueron resuspendidas en 500 μ l de una serie de tampones de calibración (MES 50 mM, HEPES 50 mM, KCl 50 mM, NaCl 50 mM, acetato de amonio 200 mM, NaN₃ 10 mM, 2-desoxiglucosa 10 mM) ajustados a pH 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 y 8, respectivamente. Estas suspensiones, también ajustadas a una D.O. de 1,5, fueron incubadas 30 minutos a 30°C en agitación. Transcurrido este periodo se transfirieron, por cuadruplicado, 100 μ l de cada suspensión celular, a una placa multipocillo de fondo plano (Nunc, Dinamarca).

A continuación se midió la emisión de fluorescencia de pHluorina a 530 nm después de la excitación a 380 nm (I_{380}) y 485 nm (I_{485}) utilizando un lector de fluorescencia de microplacas FL600 (Bio-Tek Instruments, Inc. EE.UU.). A todas las señales de intensidad de fluorescencia se les restaron la señal de fondo usando los datos obtenidos de las cepas sin transformar, carentes de pHluorina. A partir de la curva de calibrado del ratio I_{380} / I_{485} frente al pH, se obtuvo una ecuación polinomial de tercer grado usando el software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., EE. UU.). Para estimar el pH citosólico de las muestras problema,

se obtuvieron los ratios I_{380} / I_{485} y empleando la curva de calibrado se obtuvieron los valores de pH correspondientes.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL FRENTE A CASPOFUNGINA

La caspofungina es un lipopéptido de la familia de las equinocandinas cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de β -1,3-glucano, componente principal de la pared celular de la levadura, ejerciendo su efecto sobre la enzima Fks1 (Onishi *et al*, 2000). El objetivo inicial de este trabajo consistió en caracterizar la participación de la MAP quinasa de la ruta de integridad celular (CWI) Slt2 en la respuesta transcripcional inducida por caspofungina, teniendo en cuenta que en tres trabajos previos se había descrito el perfil transcripcional global correspondiente a la cepa silvestre (Agarwall *et al*, 2003; Reinoso-Martín *et al*, 2003, Bermejo *et al*, 2010), además de observarse su completa dependencia del sensor de la ruta, Wsc1 (Bermejo *et al*, 2010).

Con esta finalidad, en primer lugar se ha analizado la respuesta transcripcional global de la cepa silvestre BY4741 de *S. cerevisiae* frente a caspofungina con el objetivo de disponer de datos transcripcionales en las mismas condiciones que las cepas mutantes analizadas a continuación. Se compararon, utilizando tres réplicas biológicas, los perfiles transcripcionales mediante microarrays de DNA de la plataforma Afymetrix en ausencia y presencia de caspofungina a una concentración subletal de 15 ng/ml durante dos horas a 24°C en medio de cultivo YPD. El resultado de la comparación de las muestras en presencia y ausencia de la droga mostró la inducción estadísticamente significativa de la expresión de 211 genes (ratio de expresión ≥ 2 ; p-value < 0,05) en presencia de caspofungina (Tabla Suplementaria 1), siendo el fenómeno de represión prácticamente inexistente.

Además, en un único experimento, utilizando cantidades equimoleculares de tres muestras de RNA con las que se realizaron los microarrays, se obtuvieron los perfiles transcripcionales de la levadura en presencia y ausencia de caspofungina mediante *RNA-Sequencing* (RNA-Seq). Esta técnica permite cuantificar la cantidad de mRNA en una muestra biológica con un elevado grado de sensibilidad aplicando técnicas de secuenciación masiva (Chu & Corey, 2012). Así, el análisis mediante RNA-Seq reveló la activación transcripcional de 350 genes, 158 de los cuales están incluidos en el grupo de 211 cuya inducción fue detectada a través de los estudios de microarrays de DNA, junto con 32 genes con ratios próximos a 2, lo que supone un elevado grado de similitud en los resultados obtenidos mediante ambas aproximaciones. La única diferencia

significativa a nivel global fue que la técnica del RNA-Seq permitió detectar la inhibición en respuesta a caspofungina de un grupo de genes asociados a la ruta de filamentación (ratio de expresión < 0,5).

Desde un punto de vista funcional, utilizando la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (SGD) fueron asignados a diferentes grupos funcionales los 211 genes inducidos frente a caspofungina (Figura 7). 27 de estos genes (12,8%) están relacionados con respuesta general a estrés, 26 con transporte (un 12,3%) y 37 con metabolismo, correspondiendo 19 de estos a metabolismo de carbohidratos (9%) y 10 a metabolismo de aminoácidos (4,7%). Además, los genes inducidos relacionados funcionalmente con la pared celular corresponden a un 7,6% del total y es destacable que 13 genes, un 6,2%, aparecen incluidos en la categoría de transducción de señales. Finalmente el 27,5% de los genes inducidos en respuesta a caspofungina siguen siendo actualmente de función desconocida.

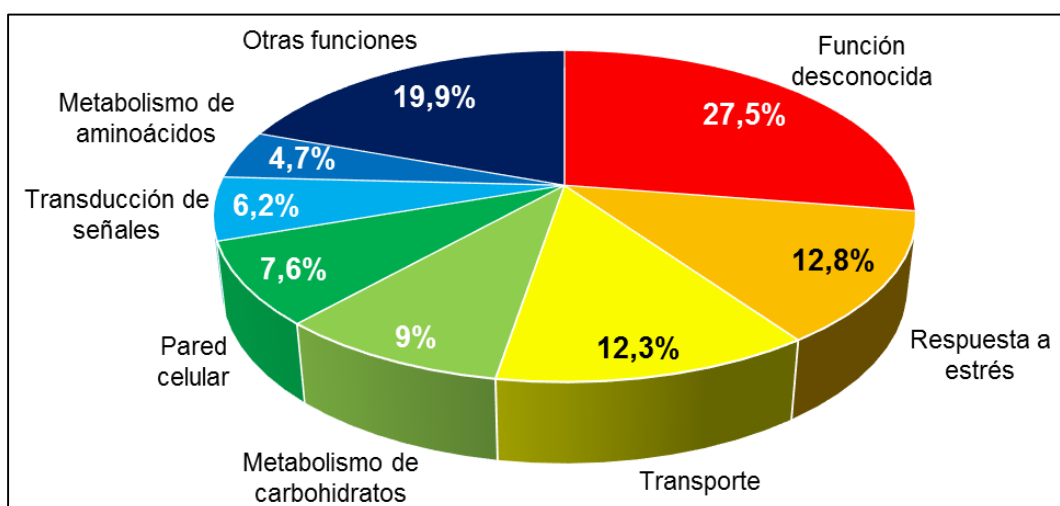


FIGURA 7. Clasificación funcional de los genes inducidos en una cepa silvestre en presencia de caspofungina durante dos horas utilizando la base de datos SGD.

A continuación, se realizó la comparación del perfil transcripcional de *S. cerevisiae* en respuesta a caspofungina con los perfiles de expresión previamente descritos en respuesta a Rojo Congo y a zimoliasa (Sanz *et al*, 2012; García *et al*, 2009), dos sustancias que afectan a la integridad de la pared celular mediante mecanismos de acción diferentes a la caspofungina. El tratamiento con Rojo Congo, sustancia que se une a la quitina, conduce a la activación de 127 genes (Sanz *et al*, 2012), 90 de los cuales están incluidos en la respuesta a caspofungina (Figura 8 y Tabla Suplementaria 1). La zimoliasa, cóctel enzimático con actividad glucanasa y quitinasa (Rodríguez *et al*, 2013)

induce la activación de 77 genes (García *et al*, 2009), 48 de los cuales también se encuentran inducidos frente a caspofungina (Figura 8 y Tabla Suplementaria 1). Es importante destacar que el análisis comparativo de los resultados muestra la existencia de 32 genes cuya transcripción es activada tanto en presencia de caspofungina como de Rojo Congo y zimoliasa (Figura 8). Desde un punto de vista funcional, como se observa en la Figura 8B, este grupo incluye 9 genes relacionados fundamentalmente con la pared celular y 5 con la transducción de señales, entre los cuales se encuentran *SLT2* y su pseudoquinasa *MLP1*, lo que sugiere la importancia de todos ellos en el mantenimiento de la integridad celular en situaciones de estrés sobre la pared.

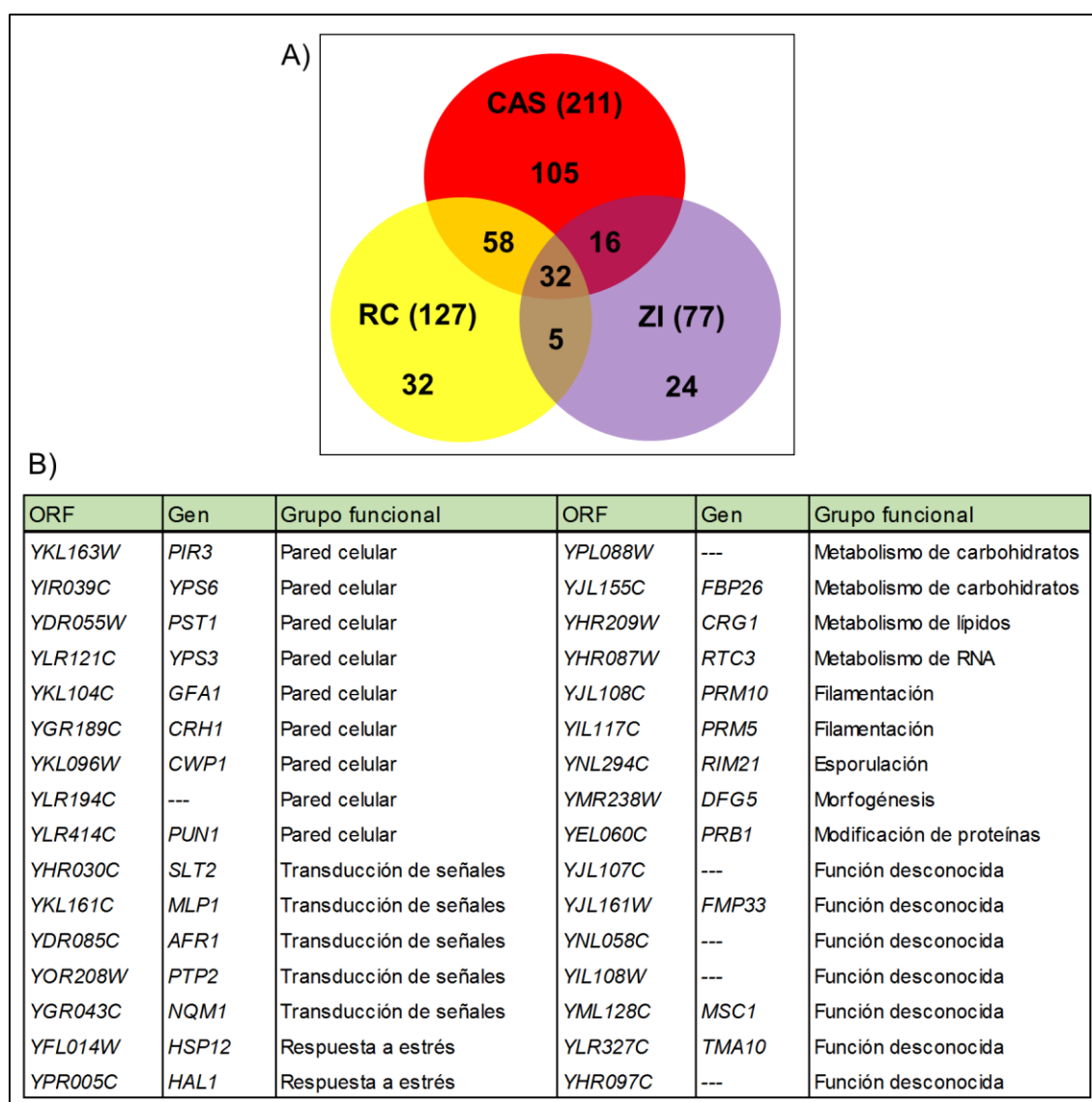


FIGURA 8. A) Comparación global de las respuestas transcripcionales a caspofungina (CAS), a Rojo Congo (RC) y a zimoliasa (ZI). Entre paréntesis se indica el número total de genes cuya expresión se induce debido a cada tratamiento. **B) Grupo común de genes inducidos en presencia de caspofungina, Rojo Congo y zimoliasa.** Este listado incluye la categoría funcional a la que está asociado cada uno de los genes.

Como se desprende de la comparativa global de las respuestas descritas en la Figura 8A, en el caso de la caspofungina se observa la inducción transcripcional de un número muy elevado de genes (105) que no se inducen con el tratamiento con Rojo Congo o zimoliasa. Es importante destacar que en este grupo solo un gen está relacionado con la pared celular y otro con la transducción de señales.

Con la finalidad de estudiar más a fondo las respuestas transcripcionales inducidas por la inhibición de la β -1,3 glucán sintasa decidimos caracterizar la respuesta transcripcional global frente a aminocandina, otro fármaco de la familia de las equinocandinas cuyo mecanismo de acción es también la inhibición de la actividad β -1,3-glucán sintasa. Comparando los perfiles transcripcionales obtenidos mediante microarrays de DNA en ausencia y presencia de aminocandina (15 ng/ml) durante dos horas en medio YPD se ha observado la inducción de 300 genes (Tabla Suplementaria 2). Cabe destacar que 189 de esos 300 genes están incluidos en los 211 que se inducen frente a caspofungina. Además, de los 111 restantes que se inducen frente a aminocandina, 92 presentan un ratio de activación frente a caspofungina superior a 1,5.

Estudios previos a este trabajo han abordado la caracterización de la respuesta transcripcional global a caspofungina en cepas silvestres de *S. cerevisiae*, siendo el realizado por *Agarwal et al*, 2003, utilizando también la plataforma Affymetrix el que muestra un número de genes inducidos más próximo a nuestro estudio, 137 genes, estando 85 de ellos, casi dos tercios del total, inducidos también en nuestro caso (Tabla Suplementaria 1). La alta variabilidad obtenida entre los diferentes estudios realizados puede ser consecuencia tanto de la utilización de diferentes fondos genéticos como del uso de diferentes plataformas de microarrays, o incluso de variaciones en la actividad de la caspofungina utilizada.

2. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A CASPOFUNGINA

La participación de la ruta de integridad celular (CWI) en la regulación de la respuesta a caspofungina ha sido previamente establecida en base a la necesidad del sensor Wsc1 para la transcripción de los genes inducidos en presencia de caspofungina (Bermejo *et al*, 2010). De hecho, este mismo resultado lo hemos obtenido al analizar el perfil transcripcional global en ausencia y presencia de caspofungina de una cepa *wsc1Δ* empleando la plataforma de microarrays de DNA utilizada en este trabajo.

Con la finalidad de estudiar la dependencia de diferentes elementos de la ruta CWI en la activación de la misma en presencia de caspofungina se llevaron a cabo ensayos de *Western-Blot* utilizando un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada y por tanto activada de Slt2. Estos estudios se realizaron sobre cepas delecionadas en los genes codificantes para el sensor Wsc1, las GEFs de Rho1 Rom1, Rom2 y Tus1, los componentes del módulo de MAP quinasas Mkk1/2, Bck1 y Slt2 y el factor de transcripción Rlm1 (Figura 9).

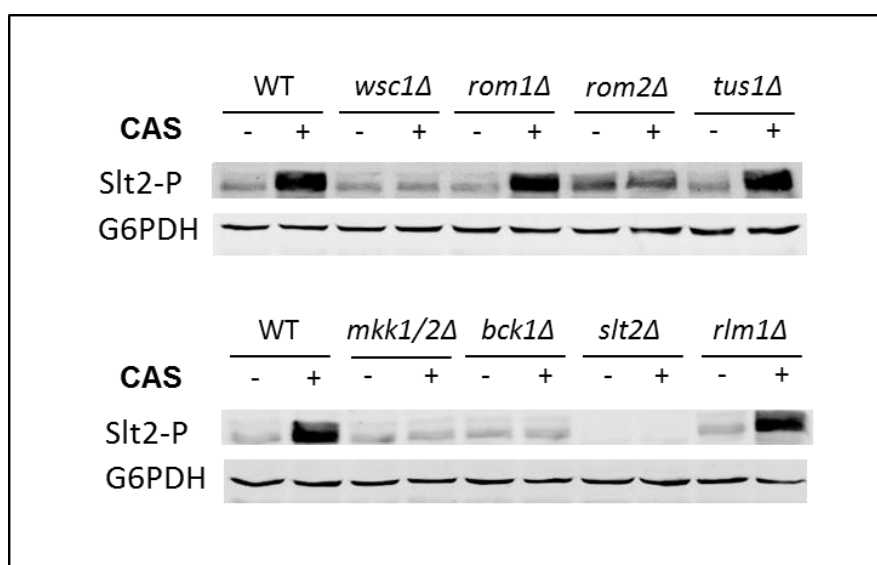


FIGURA 9. Estudio de la activación de la MAPK Slt2 en presencia de caspofungina en mutantes en elementos de la ruta CWI. Se analizó mediante *Western-Blot* el nivel de fosforilación de Slt2 (Slt2-P) en una cepa silvestre y en las cepas *wsc1Δ*, *rom1Δ*, *rom2Δ*, *tus1Δ*, *mkk1/2Δ*, *bck1Δ*, *slt2Δ* y *rlm1Δ* crecidas en ausencia y presencia de caspofungina (15 ng/ml) durante 2 horas a 24°C. Se utilizaron los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42, que reconoce la forma fosforilada de Slt2 y anti-6GPDH como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes. La imagen corresponde a un experimento representativo.

Como se observa en la Figura 9, la activación de Slt2 inducida por caspofungina depende de Wsc1, de Rom2, de Mkk1/2 y de Bck1. Sin embargo, la ausencia de Rom1 y Tus1 no afecta a la señalización a través de la ruta. Además, como era de esperar, la ausencia de Rlm1 tampoco afectó a la activación de Slt2.

En paralelo se realizó un análisis funcional de los diferentes componentes de la ruta de integridad celular en respuesta a caspofungina mediante ensayos fenotípicos consistentes en la caracterización de la sensibilidad frente al fármaco de los mutantes *wsc1Δ*, *rom1Δ*, *rom2Δ*, *tus1Δ*, *bck1Δ*, *mkk1/2Δ*, *slt2Δ* y *rlm1Δ*, además de la cepa silvestre. Para ello se realizaron ensayos de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a caspofungina en medio líquido en formato de placa multipocillo (ver Materiales y Métodos). La CMI observada para el mutante del sensor Wsc1 fue de 1 µg/ml, muy superior a la de la cepa silvestre (125 ng/ml). Por el contrario, el mutante *slt2Δ* mostró un fenotipo de hipersensibilidad, situándose la CMI aproximadamente en 30 ng/ml. Los mutantes *rom1Δ*, *tus1Δ* y *rlm1Δ* mostraron un nivel de sensibilidad a caspofungina similar al observado en la cepa silvestre, mientras que en el caso de los mutantes *rom2Δ*, *bck1Δ* y *mkk1/2Δ* se observó un mayor nivel de sensibilidad al fármaco, aunque sin llegar al nivel del ya descrito mutante *slt2Δ* (Figura 10). Por tanto, se observa una correlación entre los datos de activación de la ruta CWI y de sensibilidad frente a la droga, excepto en el caso del sensor Wsc1.

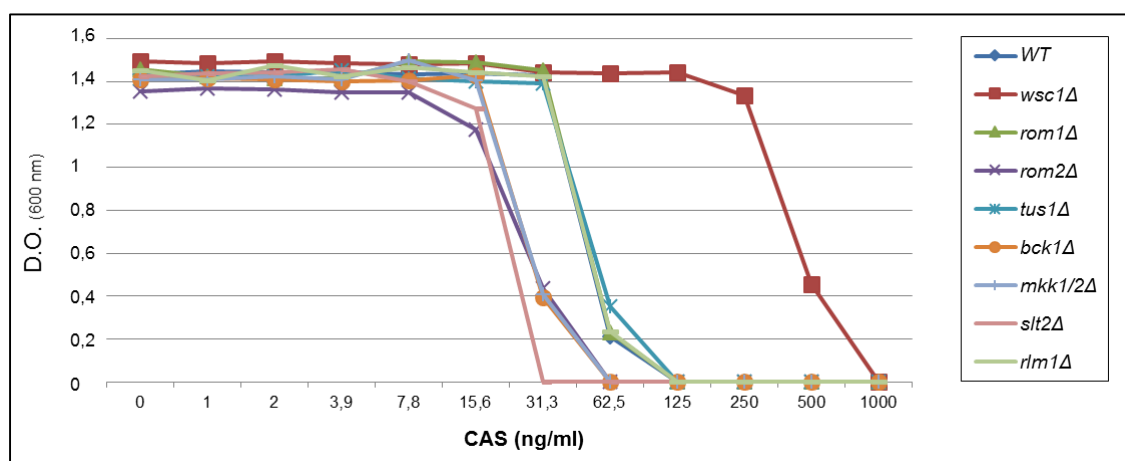


FIGURA 10. Estudio de sensibilidad frente a caspofungina en diferentes mutantes de la ruta CWI. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante diluciones seriadas de caspofungina en placa multipocillo en las cepas indicadas crecidas en medio YPD a 30°C. La lectura de la D.O. se realizó a las 48h. Se realizaron 3 experimentos independientes. Se muestran los datos de un experimento representativo.

2.1. ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE Slt2 EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A CASPOFUNGINA

A partir de los datos anteriores y con el objetivo de obtener una visión global de la implicación de Slt2 y Rlm1 (MAPK y factor de transcripción de la ruta CWI respectivamente) se caracterizó el transcriptoma de los mutantes de estos dos componentes en presencia y ausencia de caspofungina utilizando microarrays de DNA. Así, la activación transcripcional de 72 de los 211 genes inducidos en respuesta al fármaco en una cepa silvestre fue dependiente de Slt2. Los resultados obtenidos en el mutante *rlm1Δ* fueron similares a los obtenidos en la cepa *slt2Δ* (Tabla suplementaria 3).

Desde un punto de vista funcional, las funciones principales asignadas a los 72 genes cuya activación transcripcional se ve bloqueada en el mutante *slt2Δ* fueron: pared celular (15,3%), transporte (15,3%), transducción de señales (12,5%) y respuesta a estrés (9,7%) (Figura 11A). Es destacable que genes relacionados con pared celular y transducción de señales se encuentren más representados en relación con la respuesta global de los 211 genes, donde estos genes suponían un 6,2 y un 8,5% de la respuesta respectivamente (Figura 7).

Además, la respuesta transcripcional causada por el tratamiento con caspofungina en *S. cerevisiae* incluye un grupo mayoritario de genes (139; un 65,9% sobre el total) cuya inducción no depende de la MAP quinasa Slt2 (Tabla suplementaria 3). Como puede observarse en la figura 5B los principales grupos funcionales asociados a estos 139 genes son la respuesta a estrés general (14,4%), el transporte (10,8%), el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y lípidos y la obtención de energía, que de forma conjunta suponen un 26,6% del total de este grupo.

La comparación de estos datos indica que las funciones más representadas en de la respuesta dependiente de Slt2, transducción de señales y pared celular, son funciones minoritarias en el caso de la parte independiente de la MAPK de la ruta CWI, mientras que por el contrario, las funciones de respuesta a estrés, metabolismo y obtención de energía se encuentran específicamente asociadas a la parte de la respuesta no regulada por Slt2.

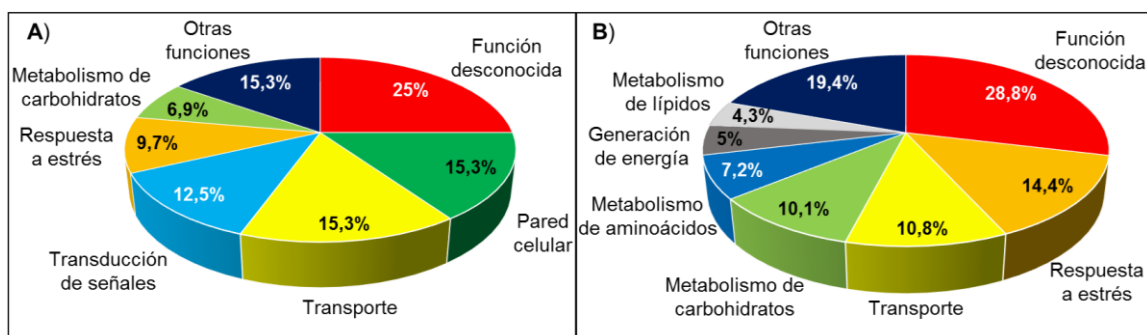


FIGURA 11. Distribución funcional de los genes inducidos de forma dependiente (A) e independiente (B) de Slt2 en presencia de caspofungina utilizando la base de datos SGD.

Con la finalidad de poder asociar las respuestas transcripcionales a caspofungina, dependientes e independientes de la MAP quinasa Slt2 con factores de transcripción potencialmente implicados en su regulación se utilizó la herramienta bioinformática YEASTRACT (*Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking*). Esta aplicación permite la identificación de factores de transcripción relacionados (experimental o documentalmente) con un grupo de genes determinado. También posibilita la identificación de sitios de unión a factores de transcripción descritos previamente (Monteiro *et al*, 2008).

Como era de esperar, en el análisis de los genes cuya transcripción es dependiente de Slt2 destacó la presencia del factor de transcripción Rlm1, asociado, con mayor significación estadística, aproximadamente al 80% de los 72 genes dependientes de Slt2 (Tabla 6). Los factores de transcripción Gcn4, Ste12, Tec1 y Ace2 también aparecen como potencialmente relacionados con este grupo de genes. El análisis de los genes no dependientes de Slt2 indica la asociación más destacada con los factores de transcripción Msn2 y Msn4 (factores de transcripción de respuesta a estrés general), asociados al 94,24 y al 86,33% de los genes, respectivamente, y Bas1 (factor de transcripción implicado en la regulación de la síntesis de aminoácidos), asociado al 92,09% de los genes (Tabla 6) con valores de *p*-value muy significativos. Es importante destacar que más del 80% de los genes no dependientes de Slt2 presentan en su región promotora sitios STRE (*Stress Response Elements*) (AGGGG), los motivos de unión de Msn2/4. Estos datos concuerdan con las funciones de respuesta a estrés y metabolismo ampliamente representadas en esta parte de la respuesta no dependiente de Slt2. Por el contrario, Rlm1 que estaba asociado al 81,94% de los genes dependientes de Slt2 lo está al 68,35% de los genes independientes de la MAP quinasa, descenso esperable al no estar estos genes regulados por Slt2 en respuesta a caspofungina. La aparición de nuevo de los factores Gcn4,

Ste12, Tec1 y Ace2 como asociados a los genes Slt2 independientes sugiere que no existe regulación específica de los mismos vía Slt2.

Factor de transcripción	%DRA	p-value	Sitios de unión al FT	Descripción
Genes Slt2 dependientes				
Rlm1	81,94	0,00E+00	66,67	Ruta CWI
Gcn4	75,00	3,12E-09	68,05	Biosíntesis de aminoácidos
Ste12	80,56	6,95E-07	25,00	Crecimiento filamentoso
Tec1	79,17	1,76E-06	80,55	Crecimiento filamentoso
Ace2	87,50	1,82E-05	22,22	División celular
Genes Slt2 independientes				
Msn2	94,24	0,00E+00	80,57	Respuesta a estrés
Msn4	86,33	0,00E+00	80,57	Respuesta a estrés
Gcn4	86,61	0,00E+00	61,15	Biosíntesis de aminoácidos
Bas1	92,09	0,00E+00	30,21	Biosíntesis de aminoácidos
Swi5	75,54	0,00E+00	25,17	Expresión génica en <i>MG1</i>
Tec1	79,86	2,47E-11	79,86	Crecimiento filamentoso
Ace2	89,21	2,59E-10	25,17	División celular
Ste12	75,54	5,02E-08	17,26	Crecimiento filamentoso

TABLA 6. Asociaciones transcripcionales documentadas del conjunto de genes Slt2 dependientes y Slt2 independientes en la respuesta a caspofungina. DRA, porcentaje de genes que muestran asociaciones reguladoras documentas con factores de transcripción deducidas mediante el análisis con el programa bioinformático YEASTRACT. Los sitios de unión al factor de transcripción hacen referencia al porcentaje de genes que en sus promotores muestran al menos un dominio de unión al DNA para el factor de transcripción correspondiente. Se muestran factores de transcripción con porcentajes de DRA superiores al 75% de los genes analizados y estadísticamente significativos ($p < 0,001$), dispuestos en orden decreciente de este dato.

2.2 VALIDACIÓN DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

Los datos de expresión procedentes de microarrays de DNA se validaron mediante la técnica de qRT-PCR. Para ello se seleccionaron 6 genes con un ratio de activación elevado, cuya inducción es dependiente de Slt2 en 3 de ellos (*MLP1*, *PRM5* y *AFR1*) e independiente en otros 3 (*ADL3*, *HXT5* y *CTT1*). En general, los datos obtenidos mediante la q-RT-PCR fueron similares a los obtenidos en los microarrays (Figura 12 y Tablas suplementarias 1 y 3). Además, se extendió el análisis de la expresión de estos genes a los mutantes *wsc1Δ* y *rom2Δ*. Esto permitió confirmar por un lado la dependencia del sensor de la ruta CWI en la activación transcripcional de los genes tanto dependientes como independientes de Slt2 y por otro, la implicación de la GEF de Rho1 Rom2 en la señalización solamente de la parte de la respuesta regulada por la MAP quinasa.

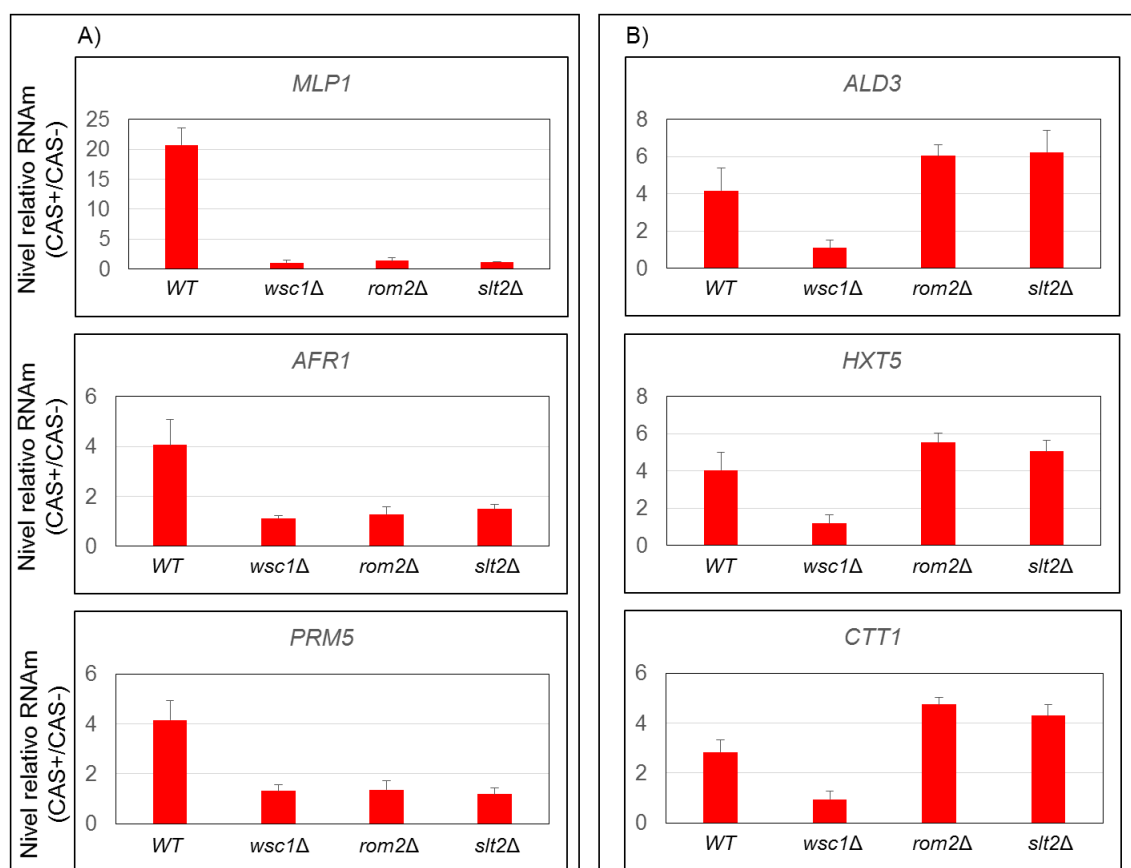


FIGURA 12. Estudio de la activación transcripcional de *MLP1*, *AFR1*, *PRM5*, *ALD3*, *HXT5* y *CTT1* por caspofungina. A) Se llevó a cabo el análisis de la inducción por caspofungina (15 ng/ml) durante 2h de los genes cuya activación depende de Slit2 *MLP1*, *AFR1* y *PRM5* por q-RT-PCR en la cepa silvestre y en los mutantes de la ruta CWI *wsc1Δ*, *rom2Δ* y *slt2Δ*. B) Se llevó a cabo el análisis de la inducción por caspofungina de los genes cuya activación es independiente de Slit2 *ALD3*, *HXT5* y *CCT1* en las mismas condiciones y en las mismas cepas. Los valores mostrados corresponden al valor medio del ratio de expresión en presencia y ausencia de caspofungina junto con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3).

2.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A CASPOFUNGINA INDEPENDIENTE DE Slit2 CON DATOS DE EXPRESIÓN A ESCALA GENÓMICA

Una vez descartada a escala genómica la implicación de la MAP quinasa Slit2 en la activación de 139 de los 211 genes que se inducen en respuesta a caspofungina, nos propusimos de caracterizar el mecanismo de regulación de este grupo mayoritario de genes. Una de las grandes ventajas de los microarrays es que permiten la identificación y comparación de patrones de expresión génica a escala genómica pudiendo aportar información útil en la caracterización de la regulación de determinadas respuestas transcripcionales. En nuestro caso, utilizamos como software de minería de datos de expresión la herramienta bioinformática MARQ (*Microarray Rank Query*). Esta aplicación permite comparar conjuntos de genes, tanto reprimidos como inducidos en determinadas circunstancias, con la base de datos de genómica funcional GEO (*Gene*

Expresion Omnibus) permitiendo así identificar condiciones que dan lugar a patrones de expresión similares u opuestos (Vázquez *et al*, 2010).

Los resultados del análisis con MARQ muestran una similitud estadísticamente significativa entre la respuesta transcripcional a caspofungina independiente de Slt2 con patrones de expresión en situaciones de ausencia de fuente de carbono (Bradley *et al*, 2009) y fase estacionaria (Gasch *et al*, 2000), ya que dentro del grupo de los 139 genes se encuentran 102 genes que se inducen en la primera condición y 110 en la segunda. Por el contrario, solo 33 de los 72 genes activados en presencia de Slt2 se inducen también en condiciones de ausencia de glucosa y fase estacionaria (Figura 13A). Además, el grupo de genes Slt2 independiente se encuentra reprimido en condiciones de hiperactivación de Ras2 (GEO: GSE8805) y de crecimiento en elevadas concentraciones de AMP cíclico (AMPc) (Carter *et al*, 2006), de forma que 97 de estos genes se encuentran reprimidos en cepas que expresan el alelo Ras^{Val19} y 98 en condiciones de crecimiento en presencia de AMPc extracelular añadido (Figura 13B).

La ausencia de nutrientes en el medio y la consiguiente entrada en fase estacionaria son elementos que en *Saccharomyes cerevisiae* conducen a la inhibición de la proteína PKA, responsable de la regulación del 90% de los genes implicados en el control nutricional (Thevelein & de Winde, 1999). Este fenómeno se produce a través de la inactivación de la GTPasa Ras2, responsable de la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC), que por tanto se traduce en un descenso de los niveles de AMPc intracelular, lo cual conduce a la inhibición de PKA (Rolldna *et al*, 2000; Griffioen *et al*, 2001). Esto explica que los genes inducidos en presencia de caspofungina de forma independiente de Slt2 se muestren reprimidos en condiciones de activación de la ruta cAMP/PKA, siendo estos datos compatibles con que la regulación de estos 139 genes pudiera estar mediada por la inhibición de la ruta cAMP/PKA.

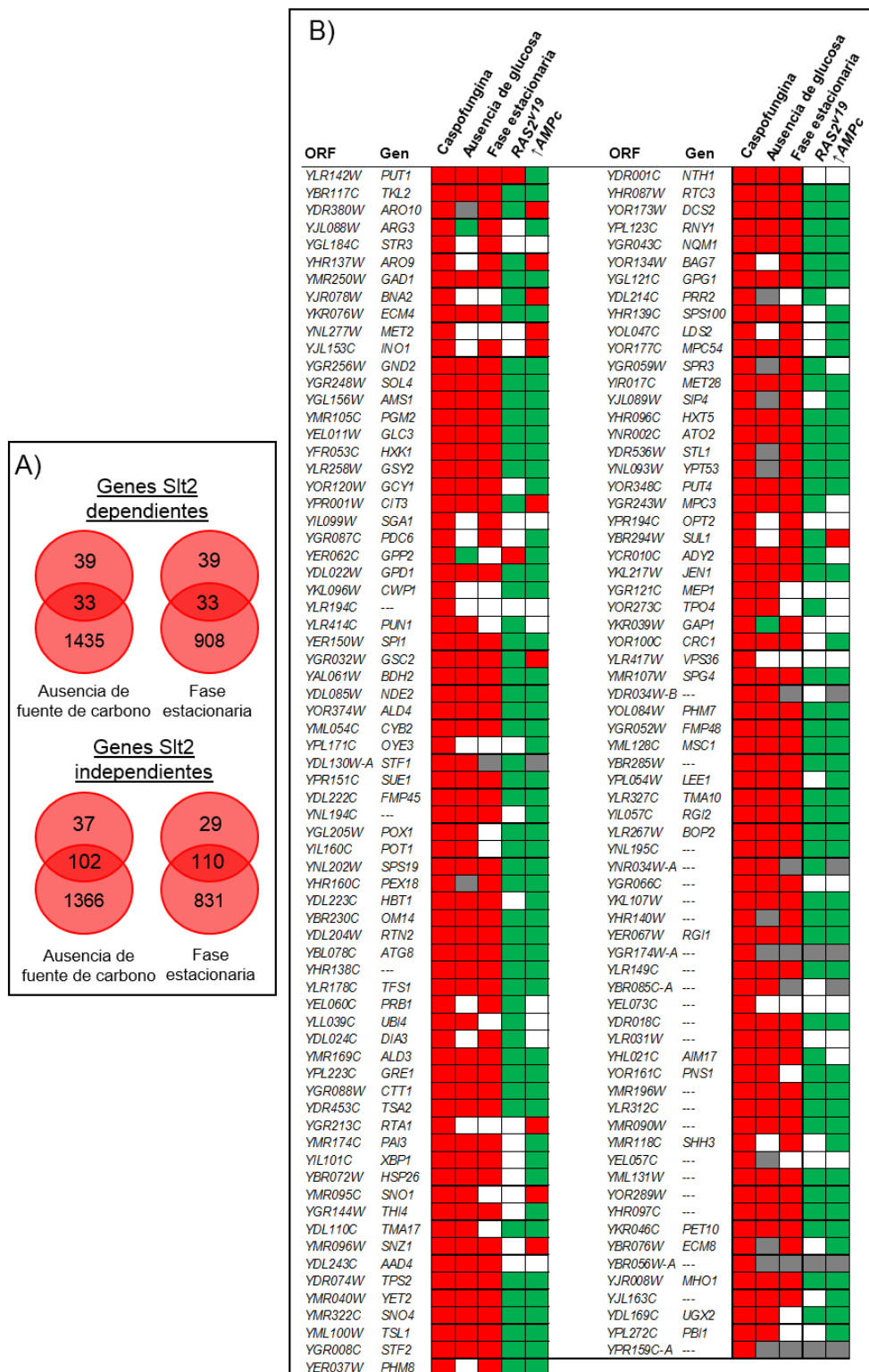


FIGURA 13. Análisis comparativo de la respuesta transcripcional a caspofungina independiente de Slt2 con otras respuestas transcripcionales. **A)** Comparación de genes inducidos por caspofungina de forma Slt2 dependiente y Slt2 independiente con los inducidos por la entrada en fase estacionaria y por la ausencia de fuente de carbono. **B)** Datos procedentes de la aplicación del programa bioinformático MARQ. Se presenta la comparativa de los genes inducidos frente al tratamiento con caspofungina de forma independiente de Slt2 con las respuestas transcripcionales en condiciones de fase estacionaria (crecimiento en medio YPD durante dos días), de ausencia de fuentes carbono (crecimiento en medio YNB en ausencia de glucosa durante dos horas), células que expresan constitutivamente un alelo activo de Ras2 (Ras2^{Val19}) y adición de AMPc (1mM). Los colores verde y rojo indican, respectivamente, los genes inducidos y reprimidos en cada condición.

3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA RUTA DE LA PROTEÍNA QUINASA A (PKA) EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A CASPOFUNGINA

3.1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Los resultados del análisis comparativo de respuestas transcripcionales obtenidos con el programa MARQ, que sugieren la implicación de la ruta cAMP/PKA en la regulación de la respuesta a caspofungina independiente de Slt2 (Figura 13), junto con la presencia de genes potencialmente regulados por Msn2 y Msn4 (Tabla 6), factores de transcripción regulados por PKA, nos llevó a estudiar a escala global el efecto de la ausencia de estos dos factores de transcripción en la respuesta a caspofungina. Para ello se realizó la comparación de los perfiles transcripcionales obtenidos mediante microarrays de DNA en presencia y ausencia de caspofungina en el doble mutante *msn2/4Δ* y a su vez se comparó con los perfiles obtenidos en la cepa silvestre.

El resultado de estos estudios indicó que 36 genes de los 211 que se inducen en respuesta a caspofungina son dependientes de los factores de transcripción Msn2 y Msn4, siendo a su vez 7 de ellos dependientes de Slt2 y 29 independientes (Tabla suplementaria 4).

Ante la presencia de una gran parte de respuesta Slt2 y Msn2/4 independiente nos propusimos investigar si la respuesta transcripcional a caspofungina independiente de Slt2 podía estar regulada a otro nivel la ruta de la proteína quinasa A (PKA). Se estudiaron mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión en ausencia y presencia de caspofungina de genes representativos de la respuesta en mutantes delecionados en elementos implicados en la ruta cAMP/PKA. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de los genes independientes de Slt2 y dependientes de Msn2/4 *ALD3*, *CTT1* y *HXT5* e independientes tanto de Slt2 como de Msn2/4 (*ALD4*, *ARO10*, *ATG8* y *NQM1*) en una cepa mutante *bcy1Δ* (subunidad reguladora de la proteína PKA que muestra actividad inhibidora sobre las subunidades catalíticas), en un doble mutante *pde1/2Δ* (fosfodiesterasas implicadas en la degradación del AMPc y cuya ausencia se traduce en un aumento del nivel intracelular de este mononucleótido), en una cepa mutante *rim15Δ* (proteína quinasa implicada en la señalización desde PKA hacia los factores de transcripción Msn2/4) y en el propio doble mutante *msn2/4Δ*. Además, como control, también se determinó en

Resultados

estas mismas cepas el nivel de expresión de los genes dependientes de Slt2 *MLP1*, *AFR1* y *PRM5* (Figura 14).

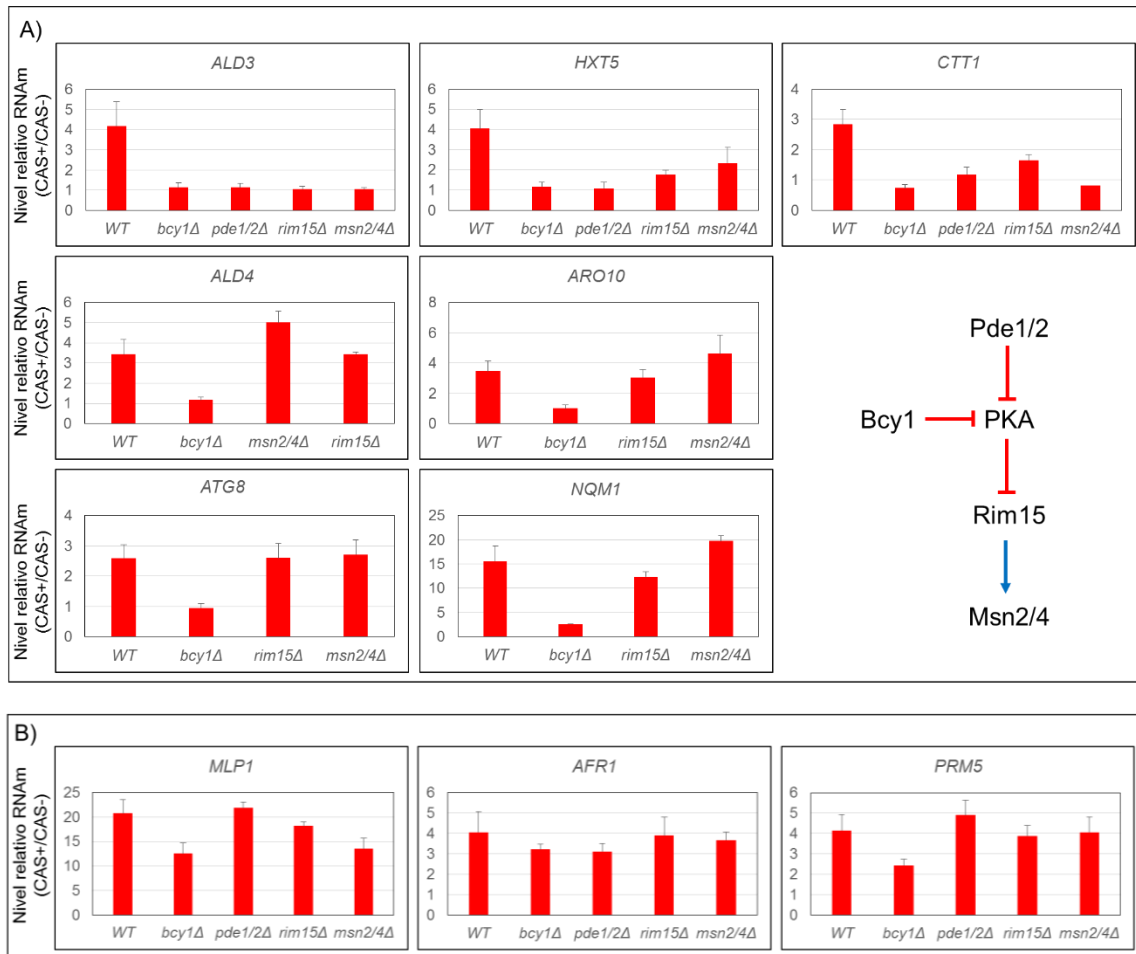


FIGURA 14. Estudio de la activación transcripcional mediante q-RT-PCR de los genes *MLP1*, *AFR1*, *PRM5*, *ALD3*, *HXT5*, *CTT1*, *ALD4*, *ARO10*, *ATG8* y *NQM1* por caspofungina. A) Se llevó a cabo el análisis de la inducción transcripcional por caspofungina de los genes independientes de Slt2, *ALD3*, *HXT5* y *CTT1*, *ALD4*, *ARO10*, *ATG8* y *NQM1*. Estos análisis se realizaron en la cepa silvestre y en los mutantes delecionados *bcy1Δ*, *pde1/2Δ*, *rim15Δ* y *msn2/4Δ*. Se incluye un esquema de la conexión de los elementos de la ruta cAMP/PKA analizados. **B)** Análisis de la inducción transcripcional por caspofungina de los genes dependientes de Slt2, *MLP1*, *AFR1* y *PRM5* por q-RT-PCR. Los valores mostrados corresponden al valor medio del ratio de expresión en presencia y ausencia de caspofungina, junto con la correspondiente desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3).

Los datos de expresión de los genes seleccionados mediante qRT-PCR en el mutante *msn2/4Δ* confirmaron los resultados obtenidos en los microarrays (Tabla suplementaria 4). Además, el aumento de la expresión de los genes independientes de Slt2 observado en la cepa silvestre se encuentra totalmente bloqueado en las cepas *bcy1Δ* y *pde1/2Δ* (figura 14A). Estos resultados apoyan la idea de que en respuesta a caspofungina la expresión de los genes independientes de Slt2 viene mediada por la inhibición de PKA. Por el contrario, los niveles de expresión de los genes dependientes de Slt2 en la cepa *pde1/2Δ*

fueron similares a los observados en la cepa silvestre (Figura 14B). En el mutante *bcy1Δ* se observa que la expresión de los genes Slt2 dependientes es algo inferior a la observada en la cepa silvestre (figura 14B). Para descartar la existencia de un efecto indirecto sobre la activación de la ruta CWI causado por la hiperactivación de las subunidades catalíticas de PKA, se estudió el efecto de la ausencia de Bcy1 sobre activación de Slt2 en presencia de caspofungina. El nivel de fosforilación de Slt2 en la cepa *bcy1Δ* en presencia de caspofungina fue similar al observado en la cepa silvestre, lo que permite descartar algún efecto a este nivel de la ruta (Figura 15).

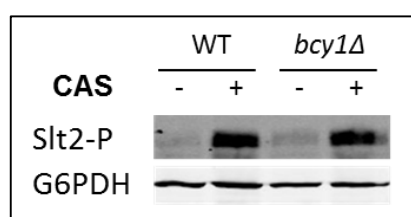


FIGURA 15. Estudio de la activación de la MAPK Slt2 en presencia de caspofungina en la cepa mutante *bcy1Δ*. Se analizó mediante *Western-Blot* el nivel de fosforilación de Slt2 en una cepa silvestre y en el mutante *bcy1Δ* creciendo en ausencia y presencia de caspofungina (15 ng/ml) durante 2 horas a 24°C. Se utilizaron los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42, que reconoce la forma fosforilada de Slt2 y anti-6GPDH (control de carga). Se realizaron 3 experimentos independientes. La imagen corresponde a un experimento representativo.

Respecto a la cepa *rim15Δ*, los datos obtenidos indican que la ausencia de esta proteína quinasa solo afecta a la expresión de los genes dependientes de Msn2/4 (*ALD3*, *CTT1* y *HXT5*), manteniéndose unos niveles de inducción similares a los de la cepa silvestre en los genes independientes de estos factores de transcripción, tanto dependientes (*MLP1*, *AFR1* y *PRM5*) como independientes de Slt2 (*ALD4*, *ARO10*, *ATG8* y *NQM1*) (Figura 14A), lo cual es coherente con el papel de activador transcripcional de Rim15 sobre Msn2/4 (Lee *et al*, 2013).

Cabe destacar que el 79% y 37% de los genes no dependientes ni de Slt2 ni de Msn2/4 presentan, respectivamente, sitios STRE y PDS (**P**ost **D**iauxic **S**hift). El motivo PDS (T(A/T)AGGGAT) corresponde a la secuencia de consenso de unión al DNA del factor de transcripción Gis1, que regula la expresión de genes relacionados con la fase postdiáuxica. Como puede observarse en la Tabla suplementaria 4, en estudios previos se ha observado que un alto número de genes que en respuesta a caspofungina se inducen de forma independiente de Slt2 y de Msn2/4 están regulados por los factores de transcripción relacionados con la ruta cAMP/PKA Gis1 y Rph1. Este último está implicado fundamentalmente en la regulación transcripcional de genes con motivos STRE entre el final la fase postdiáuxica y en la fase estacionaria temprana.

Todos los resultados mostrados sugieren que la caspofungina induce la transcripción de un conjunto de genes regulados negativamente por la ruta cAMP/PKA a través de varios factores de transcripción que podrían actuar de manera coordinada.

3.2 ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE Msn2

Los perfiles globales de expresión obtenidos del doble mutante *msn2/4Δ*, junto con los análisis bioinformáticos con los programas MARQ y YEASTRACT indican la participación de estos factores de transcripción en la regulación de la respuesta a caspofungina.

Msn2 en condiciones basales de activación de PKA se encuentra fosforilado y presenta una localización citoplasmática, mientras que en condiciones de inhibición de PKA, pierde la fosforilación y es translocado al núcleo, donde tiene lugar la activación de los genes de respuesta correspondientes (Shüller *et al*, 1997; Görner *et al*, 1998). Para profundizar en el estudio de la implicación de este factor de transcripción en la respuesta a caspofungina se llevaron a cabo estudios de localización subcelular de Msn2 en presencia y ausencia del fármaco.

Así, en primer lugar se monitorizó la localización subcelular de Msn2 en células de la cepa silvestre que expresan una fusión de Msn2 a GFP, cultivadas en ausencia y presencia de caspofungina a lo largo de 210 minutos de tratamiento mediante microscopía de fluorescencia. La cinética de la localización de Msn2 reveló un aumento gradual evidente en el porcentaje de células con localización nuclear de Msn2-GFP desde los 30 minutos de exposición al fármaco, alcanzando un pico máximo de aproximadamente un 25% de células a las 2 horas (Figura 16A). La translocación nuclear de Msn2-GFP tras 2 horas de tratamiento, evidenciada por la colocalización de la señal de fluorescencia correspondiente a GFP y a la tinción nuclear con DAPI (Figura 16C). Tras el pico de 2 horas, la localización nuclear de Msn2 disminuyó lentamente a lo largo del tiempo suponiendo un 9% de las células a los 210 minutos (Figura 16A). Contrariamente al efecto generado frente a otros tipos de estrés, donde la translocación nuclear de Msn2 generalmente se produce de forma rápida (en menos de 10 minutos) y afecta a un alto porcentaje de la población celular, la caspofungina induce este fenómeno en un porcentaje menor de células y de

forma más tardía. De acuerdo con los datos transcripcionales, la translocación nuclear de Msn2-GFP causada por la caspofungina en una cepa silvestre se anuló completamente en las cepas mutantes *wsc1Δ* y *bcy1Δ* y se redujo drásticamente en la cepa *pde1/2Δ* (Figura 16B). Por el contrario, la ausencia de los elementos de la ruta CWI Rom2, Bck1, Slt2 y Rlm1 no bloqueó la migración al núcleo de Msn2-GFP. Además es importante destacar que el efecto producido por la caspofungina parece ser específico, ya que el tratamiento durante dos horas con Blanco de calcofluor (CFW), un colorante de unión a quitina que altera la estructura de la pared celular no promovió la localización nuclear de Msn2-GFP (Figura 16B).

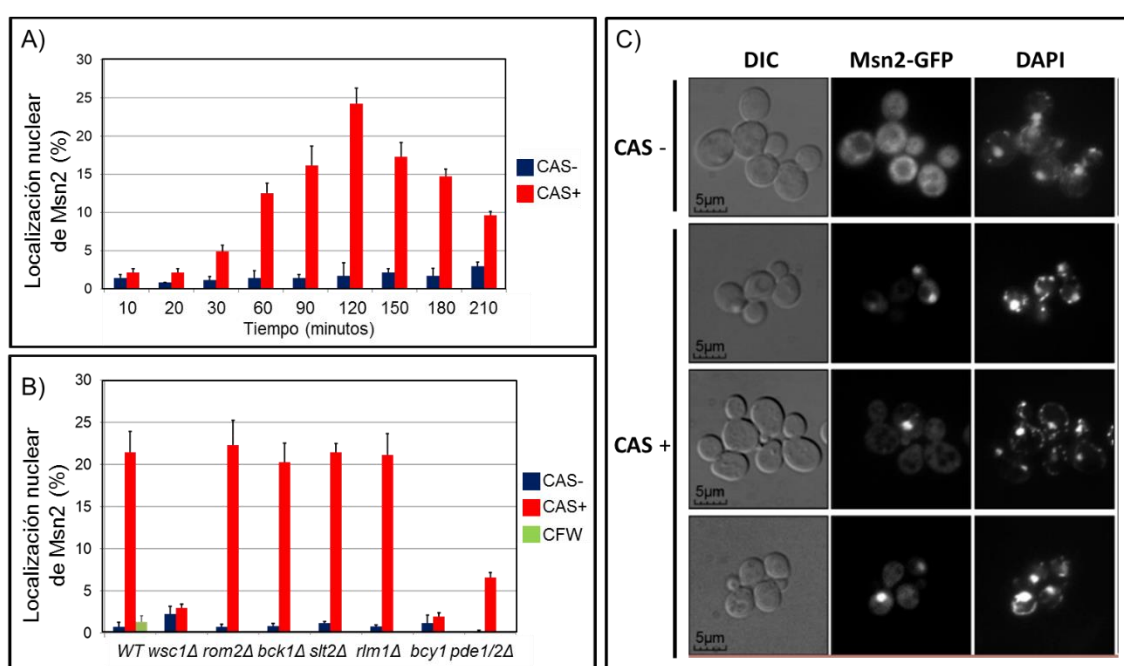


FIGURA 16. Estudio de la localización subcelular de Msn2 en presencia y ausencia de caspofungina. Los histogramas representan el porcentaje de células transformadas con el plásmido pMSN2-GFP que muestran la localización nuclear de Msn2-GFP crecidas en presencia (CAS+) o ausencia (CAS-) de 15 ng/ml de caspofungina tras su observación por microscopía de fluorescencia. **A)** Efecto observado en la cepa silvestre a lo largo del tiempo. **B)** Análisis tras dos horas de tratamiento en las cepas mutantes indicadas. Se incluye el tratamiento con Blanco de calcofluor (CFW) en la cepa silvestre. **C)** Imágenes de microscopía de fluorescencia en la cepa silvestre expresando Msn2-GFP tras dos horas de tratamiento. Se muestra, además, la tinción con DAPI de las mismas células que permite visualizar el DNA nuclear. Los valores representan las medias y la desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3), en los que se contabilizaron 300 células en cada uno.

4. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CASPOFUNGINA SOBRE LA REGULACIÓN DE PKA

4.1 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE PKA

4.1.1 Estudio de la fosforilación de Cki1

Con la finalidad de estudiar el posible efecto inhibitorio de la caspofungina sobre la ruta cAMP/PKA se llevó a cabo la monitorización de los niveles de fosforilación de una variante de la Colina quinasa Cki1, en la que en sus 200 primeros aminoácidos contiene mutaciones en dos sitios de fosforilación de la proteína quinasa C (S125A y S130A) de tal forma que se convierte en diana exclusiva de fosforilación por PKA (Deminoff *et al*, 2006; Ha *et al*, 2014). De este modo, la forma fosforilada de Cki1 indica una actividad normal de la ruta PKA, mientras que una disminución o ausencia de fosforilación de este sustrato indica una posible inhibición de la ruta.

Para ello se han utilizado cepas de *S. cerevisiae* que expresan la variante de Cki1 fusionado con Myc (pRS423-pr^{CUP}-6xMYC-cki1^{2-200(S125/130A)}). Así, mediante ensayos de *Western-Blot* utilizando un anticuerpo anti-c-myc se puede observar que la forma fosforilada de Cki1 presenta una menor movilidad electroforética que la forma no fosforilada (Figura 17). El cálculo del ratio entre la cantidad de la forma fosforilada y la forma no fosforilada sirve como método indirecto para determinar el estado de activación de PKA (ver Materiales y Métodos). Este estudio se ha realizado sobre una cepa silvestre y, con el objeto de confirmar la dependencia del sensor de la ruta CWI en la inhibición de PKA por la presencia de caspofungina, sobre el mutante *wsc1Δ*.

En la cepa silvestre la forma fosforilada de Cki1 muestra una clara disminución en presencia de caspofungina en comparación con los niveles de fosforilación que aparecen en su ausencia (Figura 17), lo que indica la inhibición de la actividad de PKA. Por el contrario, en el mutante *wsc1Δ* este fenómeno se encuentra bloqueado, no observándose diferencias en el nivel de fosforilación de Cki1 en presencia y ausencia de caspofungina.

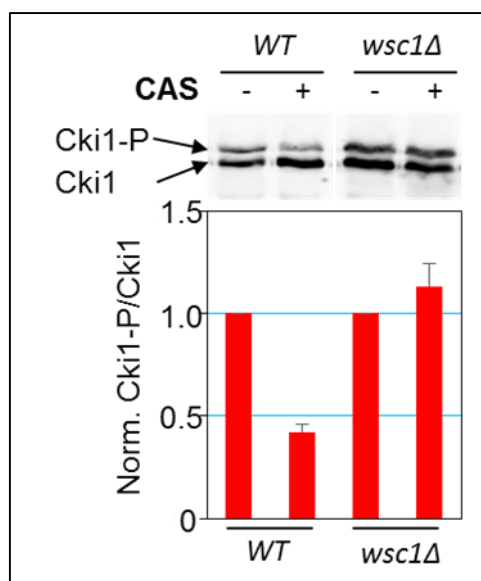


FIGURA 17. Estudio *in vivo* de la actividad de PKA en presencia y ausencia de caspofungina. Se analizó el ratio del valor entre la forma fosforilada (Cki1-P) y no fosforilada de Cki1 en extractos proteicos procedentes de una cepa silvestre y del mutante *wsc1Δ* transformadas con el plásmido pRS423-pr^{CUP}-6xMYC-*cki1*^{12-200(S125/130A)} creciendo en medio YPD en presencia y ausencia de caspofungina (CAS) (15 ng/ml) durante dos horas. Se empleó el anticuerpo anti-c-Myc para detectar el epítipo Myc fusionado a Cki1 mediante *Western-Blot*. El ratio entre la forma fosforilada y no fosforilada de Cki1 se normalizó a 1 en condiciones de ausencia de caspofungina tanto en la cepa silvestre como en el mutante *wsc1Δ*. La cuantificación de las bandas se realizó con el software Image Studio Lite 5.0. Los valores mostrados corresponden al valor medio de tres experimentos independientes, así como de sus desviaciones estandar (n=3).

4.1.2 Estudio de la fosforilación de Pat1

Con la finalidad de confirmar este efecto realizamos un análisis del nivel de fosforilación de Pat1, otro sustrato de PKA bien caracterizado implicado en el metabolismo del mRNA. Así, la forma fosforilada de Pat1 es indicativa de la actividad de PKA. De esta forma, con el objetivo de establecer la cinética de inhibición de la ruta cAMP/PKA en presencia de caspofungina se utilizó la cepa silvestre expresando el plásmido *PAT1*pro-Myc-Pat1, que expresa bajo su propio promotor una versión de Pat1 con Myc fusionado en su región N-terminal. Se recogieron muestras de estas células a los 30, 60, 90 y 120 minutos de tratamiento con caspofungina. Posteriormente se realizó una inmunoprecipitación de Pat1-Myc de los extractos celulares recogidos y, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la fosforilación en sitios diana de PKA (*anti-Phospho-PKA substrate*) (Ramachandran *et al*, 2011), se analizó el nivel de fosforilación de Pat1.

Como se muestra en la Figura 18, la casofungina induce la desfosforilación de Pat1 a lo largo del tiempo de exposición a caspofungina, siendo este efecto

evidente tras 60 minutos de tratamiento. Transcurridos 90-120 minutos desde la adición de la caspofungina, los niveles de fosforilación de Pat1 por PKA fueron solo de aproximadamente un 20% de los detectados tanto a tiempo cero de tratamiento como tras dos horas en ausencia de la droga. La cinética de inhibición de PKA ejercida por la caspofungina es diferente a la observada frente la ausencia de glucosa, condición en la cual el efecto inhibitorio es ya significativo tras 10 minutos de ayuno (Ramachandran *et al*, 2011).

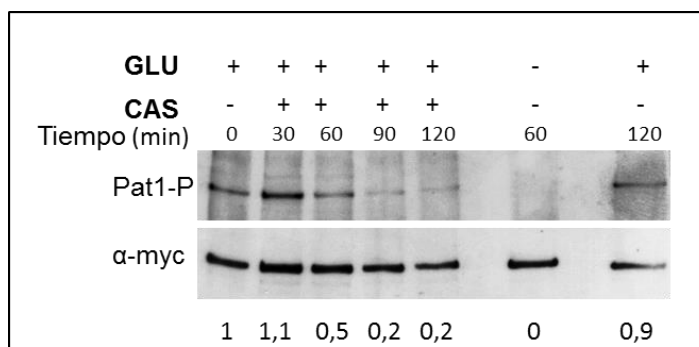


FIGURA 18. Cinética de la inhibición de PKA en presencia de caspofungina. Se analizó el nivel de fosforilación de Pat1 en una cepa silvestre que expresa la proteína de fusión *PAT1*pro-Myc-Pat1 creciendo exponencialmente en medio YPD y tratada con caspofungina (15 ng/ml) o transferida a un cultivo carente de glucosa (YP) durante los tiempos indicados. Se empleó el anticuerpo anti-c-Myc para inmunoprecipitar la proteína de fusión Pat1-Myc1 previamente a la incubación con el anticuerpo *anti-Phospho-PKA substrate* que reconoce la fosforilación por PKA. La cuantificación de las bandas se realizó con el software Image Studio Lite 5.0. Como control se analizó el efecto de la ausencia de glucosa durante 60 minutos. Se muestran los datos de un experimento representativo.

4.1.3 Determinación de glucógeno intracelular

De forma complementaria a los experimentos anteriores se llevó a cabo la determinación de los niveles de glucógeno intracelular en presencia y ausencia de caspofungina. Se planteó este experimento debido a que uno de los procesos metabólicos que se desencadenan en la célula tras la inhibición de la ruta cAMP/PKA es la acumulación de glucógeno, y se puede utilizar como una medida indirecta de la actividad de esta ruta (Schmelzle *et al*, 2004). De esta forma, la acumulación intracelular de glucógeno en presencia y ausencia de caspofungina debería corroborar los experimentos previos donde se pone de manifiesto la inhibición de PKA. Para ello se estudió la acumulación de glucógeno en respuesta a caspofungina siguiendo el método colorimétrico descrito en Materiales y Métodos.

Como se muestra en la Figura 19, el tratamiento con caspofungina de una cepa silvestre induce la acumulación de glucógeno, puesto de manifiesto por la coloración más oscura de las células tras el tratamiento. El acúmulo de glucógeno en respuesta a este fármaco no se vió afectado en los mutantes *rom1Δ*, *rom2Δ*, *tus1Δ*, *bck1Δ*, *slt2Δ* y *rlm1Δ*, de acuerdo con la independencia de la inhibición de la ruta cAMP/PKA en respuesta a la droga de la ruta CWI. Sin embargo, no se observó acumulación de glucógeno en respuesta a caspofungina en el mutante *wsc1Δ*, como se observa en la Figura 19A. Por el contrario, en las células recogidas de los cultivos de las cepas mutantes relacionadas con la ruta cAMP/PKA *bcy1Δ*, *rim15Δ* y *msn2/4Δ*, así como la cepa que expresa Ras2 activado constitutivamente (*RAS2^{Val19}*) la acumulación de glucógeno en presencia de caspofungina se encuentra ampliamente afectada (Figura 19B).

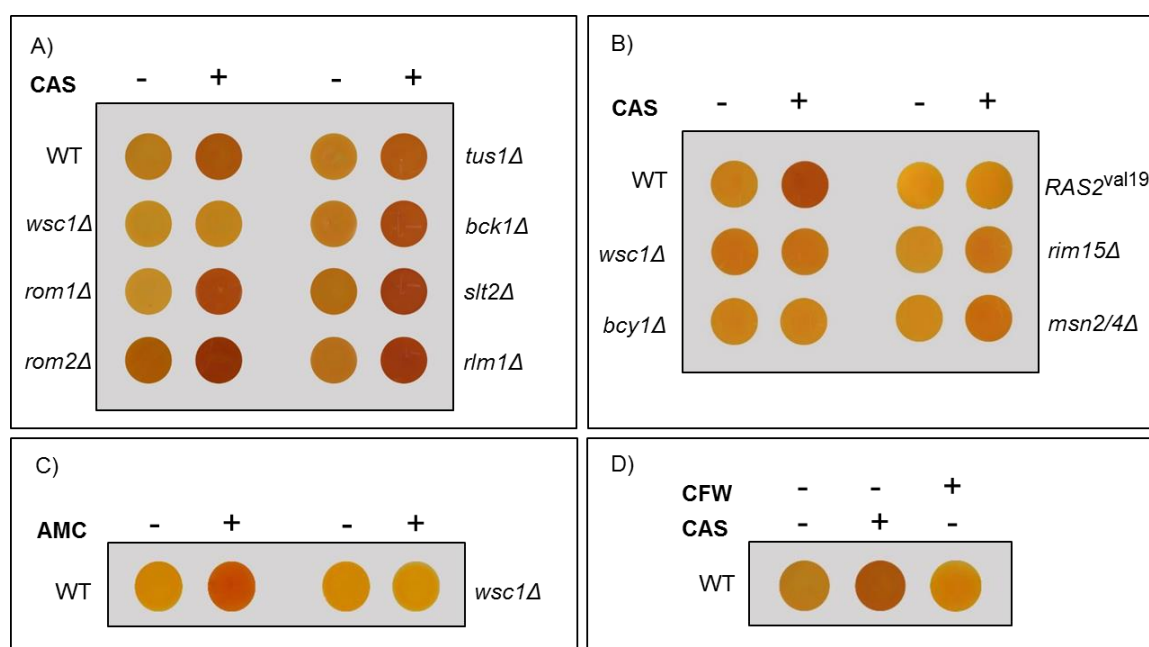


FIGURA 19. Determinación de la acumulación de glucógeno en presencia y ausencia de caspofungina. Se estudió la acumulación intracelular de glucógeno en una cepa silvestre, en mutantes deletionados en elementos de la ruta CWI (A), en mutantes deletionados en elementos de la ruta cAMP/PKA, así como en una cepa que expresa Ras2 activado constitutivamente (*RAS2^{Val19}*) (B) crecidos en medio YPD a 24°C en presencia y ausencia de caspofungina (15 ng/ml) durante dos horas. También se estudió la acumulación de glucógeno frente a aminocandina (15 ng/ml durante dos horas) en una cepa silvestre y en un mutante deletionado *wsc1Δ* (C) y frente a Blanco de calcofluor (CWF) (5 µg/ml durante dos horas) en una cepa silvestre (D). Tras el tratamiento con caspofungina las células son recogidas y resuspendidas en una solución de yodo 0,2% / yoduro potásico 0,4%. El color marrón oscuro indica mayor cantidad de glucógeno. Se muestran datos de un experimento representativo. Se realizaron al menos tres experimentos independientes para cada cepa y condición estudiada.

En apoyo a este resultado, tres de los genes de la ruta del metabolismo del glucógeno, *GPH1*, *GLC3* y *GSY2*, se inducen en respuesta a caspofungina de forma independiente de *Slf2* (Tabla suplementaria 3). También se estudió el nivel

de glucógeno intracelular en una cepa silvestre tras el tratamiento con aminocandina. En respuesta a este fármaco también se indujo la acumulación de glucógeno dependiente de Wsc1 (Figura 19C), lo que de nuevo apoya la idea de que el efecto de inhibición de PKA viene mediado por la inhibición de la actividad β -1,3-glucán sintasa. Por último, un tipo diferente de estrés sobre la pared celular como es el causado por el tratamiento con Blanco de calcofluor (CFW) no indujo la acumulación de glucógeno (Figura 19D).

Todos los resultados obtenidos muestran que la caspofungina modula negativamente la actividad de la ruta PKA.

4.2 EFECTO DE LA CASPOFUNGINA SOBRE EL NIVEL DE AMP CÍCLICO INTRACELULAR Y SOBRE LA ACTIVACIÓN DE Ras2

El mecanismo fundamental de regulación de la ruta PKA en *Saccharomyces cerevisiae* se realiza a través de los niveles de AMP cíclico (AMPc) intracelular (Toda & Sass, 1988). Condiciones ambientales de disponibilidad de glucosa y ausencia de estrés conducen a un elevado nivel intracelular de AMPc, de tal forma que este se une a las subunidades reguladoras Bcy1, provocando su disociación de las subunidades catalíticas, quedando estas libres y activando por tanto PKA. En condiciones de ausencia de glucosa que conducen a la entrada en fase de crecimiento estacionaria o en condiciones de estrés ambiental descende el nivel de AMPc intracelular, liberándose por tanto las subunidades Bcy1 y uniéndose a las subunidades catalíticas de PKA para inhibir de esta forma su actividad (Thevelein & de Winde, 1999).

Teniendo en cuenta este mecanismo principal de regulación de la ruta cAMP/PKA se analizó si la inhibición de la proteína PKA que se produce en presencia de caspofungina estaba mediada por un descenso del nivel del AMPc intracelular. Para ello, se procedió a cuantificar los niveles de este nucleótido en células de levadura crecidas en presencia y ausencia de caspofungina mediante la técnica de enzimo-inmunoensayo de afinidad (EIA), tal y como se describe en el apartado de Materiales y métodos. En *S. cerevisiae* los niveles del AMPc intracelular se encuentran regulados mediante actividades opuestas. Una de síntesis catalizada por la enzima adenilato ciclasa (AC) y otra de degradación mediada por las fosfodiesterasas Pde1 y Pde2. La actividad AC es estimulada por las GTPasas Ras1 y Ras2, cuya activación está modulada por su unión a GDP/GTP. Así, las proteínas Ras solo en su forma unida a GTP activan a la

adenilato ciclasa. Por esta razón, como control de disminución de AMPc se utilizó un mutante *ras2Δ*, en el cual los niveles de AMPc son inferiores a los observados en una cepa silvestre (Broek *et al*, 1985; Petkova *et al*, 2010).

Las células de la cepa silvestre tratadas con caspofungina mostraron una disminución significativa de los niveles intracelulares de AMPc (14,11 fmol por mg de peso húmedo) en comparación con las células que no fueron expuestas al fármaco (19,92 fmol/mg de peso húmedo). La disminución de AMPc en presencia de caspofungina es algo inferior a la observada en el mutante *ras2Δ* (12,85 fmol AMPc/mg de peso húmedo) (Figura 20). Este resultado indica que la caspofungina ejerce un impacto significativo sobre los niveles intracelulares de AMPc, al menos al tiempo de tratamiento ensayado.

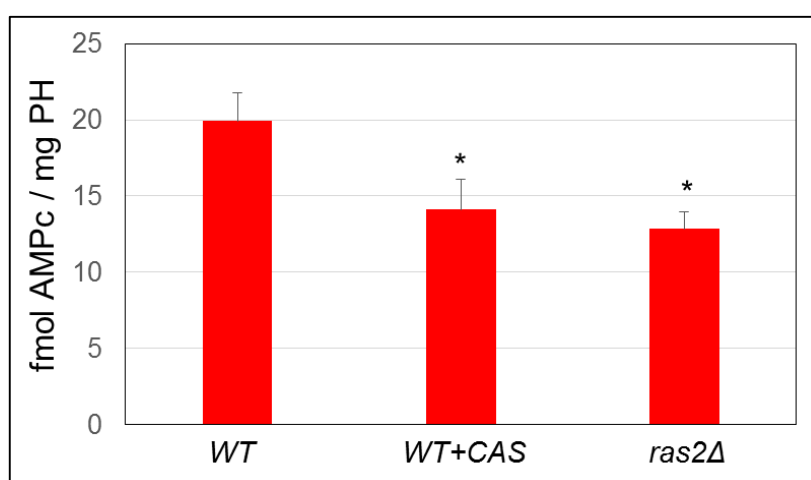


FIGURA 20. Efecto de la caspofungina sobre los niveles de AMPc intracelular. Se cuantificó el nivel de AMPc intracelular en una cepa silvestre crecida exponencialmente en medio YPD a 24°C en presencia y ausencia de caspofungina (15 ng/ml) durante dos horas. Como control se midió también el nivel de AMPc intracelular en el mutante *ras2Δ*. En los histogramas se representa el valor medio de AMPc medido en 3 experimentos independientes con la desviación estándar correspondiente (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante un Test de Student para analizar la significación de la diferencia entre el nivel de AMPc entre la cepa silvestre no expuesta al fármaco y la cepa tratada con caspofungina, así como con el mutante *ras2Δ*. $0,01 \leq *p \leq 0,02$.

A continuación, se estudió el nivel de activación de Ras2 en presencia y ausencia del fármaco. Así, se determinó en ambas condiciones la cantidad de Ras2-GTP en relación a la cantidad total de Ras2 en extractos totales de la cepa silvestre mediante ensayos de “pull-down” en los que se utilizó el dominio RBD (*Ras-binding Domain*) de la proteína Raf1 producido en *E. coli*, el cual presenta una alta afinidad por la forma activa de Ras2 (ver Materiales y métodos). Como control de inactivación de Ras2 se llevó a cabo este mismo estudio en condiciones de ausencia de glucosa en las que se ha descrito que se favorece la conversión de Ras2-GTP en Ras2-GDP (Colombo *et al*, 2004).

Resultados

El fuerte descenso (próximo al 70%) en el ratio Ras-GTP / Ras2 total que se observó en presencia de caspofungina en relación al cultivo control sin droga indica que la inhibición de PKA vía descenso del nivel de AMPc intracelular puede ser causada por la disminución de los niveles de la forma activa de Ras2 (Figura 21).

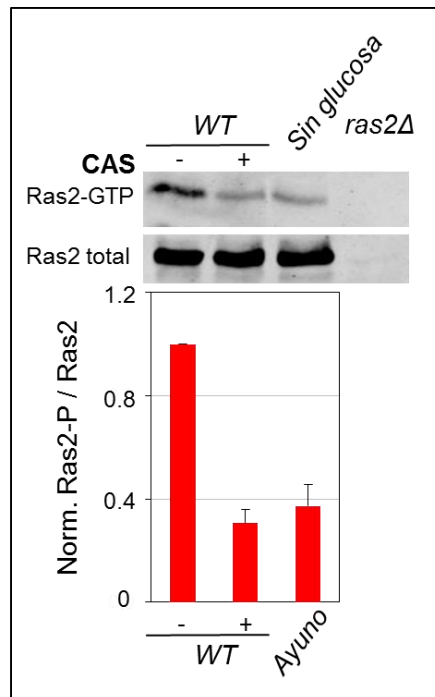


FIGURA 21. Los niveles de Ras2-GTP disminuyen en presencia de caspofungina. Se analizó el ratio del valor entre la cantidad de Ras2-GTP y la cantidad total de Ras2 en una cepa silvestre creciendo en medio YPD en presencia y ausencia de caspofungina (15 ng/ml) durante dos horas. Como controles también se analizó la cantidad de Ras2-GTP en condiciones de carencia de glucosa (creciendo en medio mínimo completo sin glucosa durante dos horas) y en el mutante *ras2Δ*. Mediante *Western-Blot* utilizando un anticuerpo Anti-Ras2 se ha detectado tanto la fracción enriquecida en Ras2-GTP como Ras2 en el extracto proteico total. El ratio entre Ras2-GTP y Ras2 se normalizó a 1 en condiciones de crecimiento exponencial en presencia de glucosa y ausencia de caspofungina. La cuantificación de las bandas se realizó con el software Image Studio Lite 5.0. Los valores mostrados corresponden al valor medio de tres experimentos independientes (n=3).

Este conjunto de resultados nos llevó a estudiar la importancia fisiológica de la inhibición de la PKA mediada por la inhibición de la β -1,3-glucán sintasa. Para ello, se evaluó la sensibilidad a caspofungina mediante la realización de ensayos de determinación de la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) por microdilución en placa multipocillo de los dobles mutantes *pde1/2Δ* (en el cual la inhibición de PKA está bloqueada por la ausencia de las fosfodiesterasas de AMPc) y *msn2/4Δ* (en el cual está bloqueada la inducción de los genes dependientes de este factor de transcripción, dependiente a su vez de la inhibición de PKA) y se comparó con la cepa silvestre. Como se muestra en la Figura 22, ambas cepas mostraron una mayor sensibilidad al fármaco en

comparación con el comportamiento de la cepa silvestre, pasando la C.M.I de 125 a 62,5 ng/ml. Este resultado apoya la idea de que la inhibición de la PKA podría ser beneficiosa para contrarrestar el efecto letal de este antifúngico sobre la levadura.

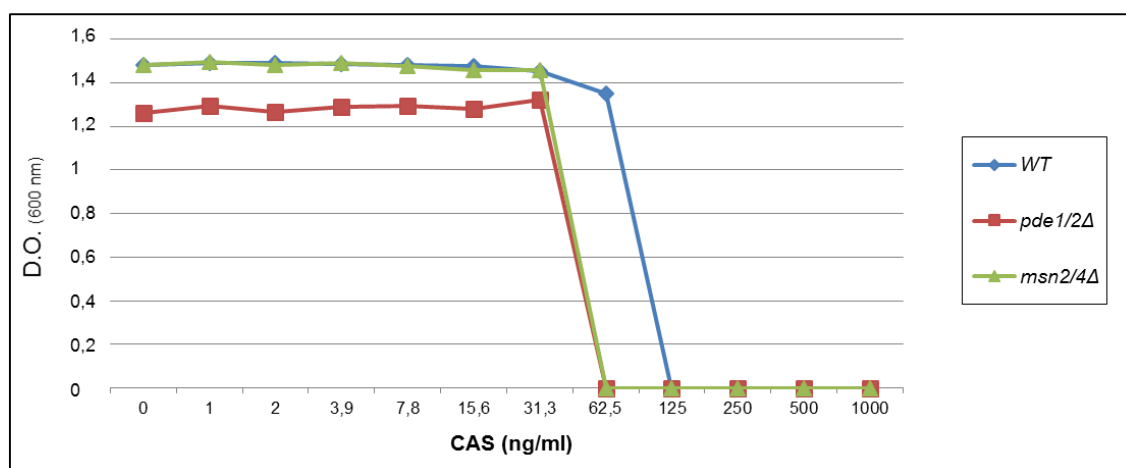


FIGURA 22. Estudio de sensibilidad frente a caspofungina en los mutantes *pde1/2Δ* y *msn2/4Δ*. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante diluciones seriadas de caspofungina en placa multipocillo en las cepas indicadas crecidas en medio YPD a 30°C. La lectura de la D.O. se realizó a las 48h. Se realizaron 3 experimentos independientes. Se muestran los datos de un experimento representativo.

5. EL TRATAMIENTO CON CASPOFUNGINA INDUCE UNA DISMINUCIÓN DEL pH INTRACELULAR

Estudios previos han determinado que el nivel de pH citosólico, asociado a la disponibilidad de glucosa, actúa como señal celular a través de la cual se regula Ras2 en respuesta a la disponibilidad de fuente de carbono. Este mecanismo de regulación se produce a través de la ATPasa vacuolar (ATPasa-V), que en condiciones de disponibilidad de glucosa en las cuales se produce un aumento del nivel del pH intracelular, activa la GTPasa Arf1, que a su vez activa Ras2 (Dechant *et al*, 2014).

Para investigar si la alteración en la activación de Ras2 en presencia de caspofungina está relacionada con variaciones del pH citosólico nos propusimos evaluar si el crecimiento en presencia de caspofungina afecta a dicho pH. Con este propósito se midió el pH citosólico *in vivo* en ausencia y presencia de la droga en una cepa silvestre que expresa una variante de la proteína verde fluorescente (GFP) denominada pHluorina. Esta proteína es sensible a variaciones de pH del medio donde se encuentra, modificando sus propiedades

de emisión de fluorescencia. Básicamente, se calcula el ratio de la intensidad de emisión de fluorescencia obtenido tras excitar las células con dos longitudes de onda diferentes, por lo que este método ratiométrico de fluorescencia permite la medición del pH intracelular en *S. cerevisiae* sin necesidad de aplicar procesos de tinción que puedan afectar a la fisiología celular.

Utilizando este método se observó como el tratamiento con caspofungina provoca en la cepa silvestre un descenso significativo del pH, desde unos valores aproximados de 6,2 hasta algo menos de 5,5 (Figura 23). El valor del pH citosólico obtenido en ausencia de caspofungina es coincidente con análisis previos para este fondo genético (Maresova *et al*, 2010). Como método de control se midió también el pH intracelular en ausencia de glucosa, con la finalidad de cuantificar el efecto sobre el pH en una condición de inhibición de la ruta cAMP/PKA mediada por Ras2. Así, en ausencia de esta fuente de carbono, el descenso del pH fue mayor que en presencia de caspofungina, hasta un valor cercano a 5.

En el mutante *wsc1Δ* no se produce ninguna variación del pH citosólico en respuesta a caspofungina, confirmándose de esta manera la implicación de este sensor, a través de la modulación del pH, en la inactivación de Ras2, y de la consiguiente inhibición de PKA. Además, la exposición de las células a Blanco de calcofluor tampoco produjo ningún efecto sobre el pH, lo cual es coherente con los datos obtenidos mediante los estudios de localización subcelular de Msn2-GFP y de acumulación de glucógeno, que indicaban que este compuesto no afecta a la ruta cAMP/PKA. Con el fin de descartar que el efecto sobre el descenso del pH se debiera a un efecto secundario mediado por la inhibición de PKA, también se midió el pH citosólico en presencia y ausencia de caspofungina en el doble mutante *pde1/2Δ*. El descenso del pH citosólico en presencia del fármaco en este doble mutante, en el cual PKA se encuentra activada, fue similar al observado en la cepa silvestre, lo que indica que la variación del pH no requiere de la previa inhibición de PKA (Figura 23).

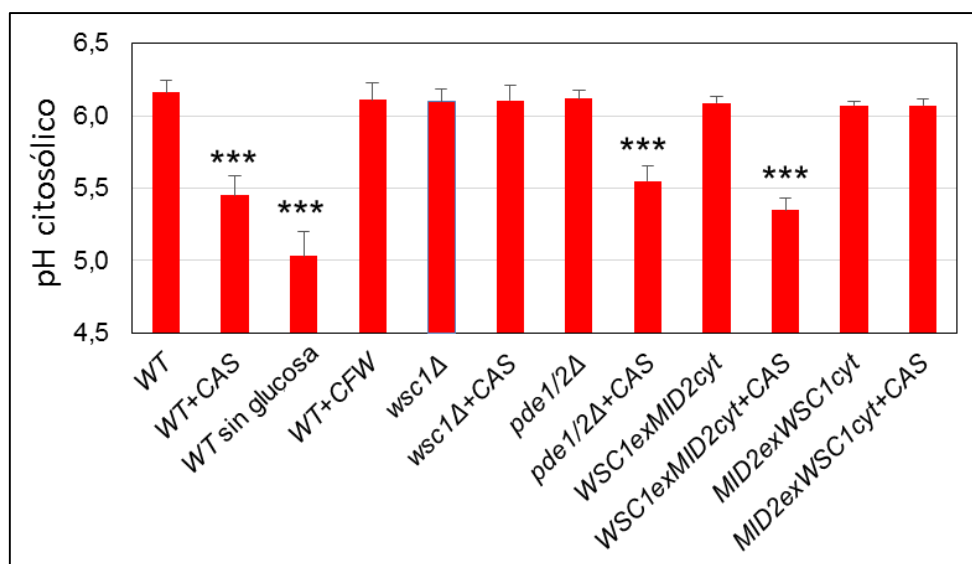


FIGURA 23. Efecto de la caspofungina sobre el pH citosólico. Se midió el pH citosólico en la cepa silvestre, en los mutantes *wsc1Δ* y *pde1/2Δ* y en las cepas quiméricas *MID2_{ex}WSC1_{cit}* y *WSC1_{ex}MID2_{cit}* transformadas con el plásmido pH-U que expresan la pHlourina credidas en medio YPD a 24°C en presencia y ausencia de caspofungina (15 ng/ml) durante dos horas. En el caso de la cepa silvestre se estudió también el pH citosólico en condiciones de carencia de glucosa (creciendo en medio mínimo completo sin glucosa) y en presencia de Blanco de calcofluor (5μg/ml) durante dos horas. Los datos representados en los histogramas corresponden a la media y la desviación estándar procedentes de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante Test de Student para analizar la significación de la diferencia entre los valores de pH citosólico: ***p ≤ 0,001.

Para obtener más información sobre los mecanismos moleculares implicados en la modulación del pH intracelular mediado por caspofungina se utilizaron además dos cepas de levadura construidas y utilizadas anteriormente en nuestro laboratorio para estudiar la contribución de los dominios extracelular y citoplásmico de los sensores principales de la ruta de integridad celular, Wsc1 y Mid2, en la señalización de la presencia del fármaco. Estas cepas contienen versiones quiméricas de los sensores, una que expresa la fusión del dominio extracelular de Mid2 a la región citosólica de Wsc1 (*MID2_{ex}WSC1_{cit}*) y otra que expresa la fusión del dominio extracelular de Wsc1 a la región citosólica de Mid2 (*WSC1_{ex}MID2_{cit}*). La medición del pH citosólico en estas cepas quiméricas determinó que en la cepa que portaba la versión Wsc1exMid2cit la caspofungina indujo una reducción del pH similar a la observada en la cepa silvestre. Sin embargo, en el caso de la cepa que expresa la fusión Mid2exWsc1cit, la reducción del pH se bloqueó completamente, imitando el comportamiento del mutante *wsc1Δ* (Figura 23). Cabe destacar que estos resultados concuerdan con los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, según los cuales, mientras que en la primera cepa la señalización vía ruta CWI en respuesta a caspofungina no está afectada, en la segunda se encuentra completamente bloqueada, poniendo de manifiesto la importancia de la región extracitoplasmática de Wsc1 para la funcionalidad de este sensor.

Resultados

Este mismo efecto se observó cuando se determinó la acumulación de glucógeno intracelular en las cepas quiméricas *MID2_{ex}WSC1_{cit}* y *WSC1_{ex}MISD2_{cit}* en presencia y ausencia de caspofungina.

Como se observa en la Figura 24, en la cepa que expresa el dominio extracelular de Mid2 y el dominio citosólico de Wsc1 la acumulación de glucógeno en respuesta a caspofungina se encuentra al menos parcialmente afectada, teniendo en cuenta que esta cepa presenta valores de glucógeno de base elevados en ausencia de estrés. Por el contrario, en la cepa que contiene el dominio extracelular de Wsc1 y el dominio intracelular de Mid2 la acumulación de glucógeno en respuesta al fármaco es igual a la observada en una cepa silvestre.

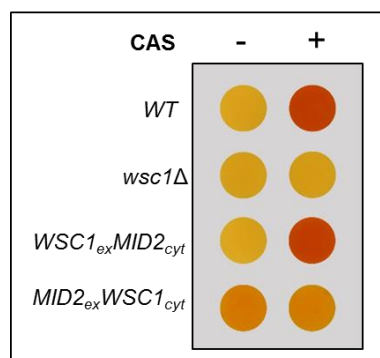


FIGURA 24. Determinación de la acumulación de glucógeno en las cepas quiméricas *MID2_{ex}WSC1_{cit}* y *WSC1_{ex}MISD2_{cit}* expuestas o no a caspofungina. Se estudió la acumulación intracelular de glucógeno en una cepa silvestre, en un mutante *wsc1Δ* y en las cepas quiméricas *MID2_{ex}WSC1_{cit}* y *WSC1_{ex}MISD2_{cit}* crecidas en medio YPD a 24°C en presencia y ausencia de caspofungina (15 ng/ml) durante dos horas. Tras el tratamiento con caspofungina las células son recogidas y resuspendidas en una solución de Iodo 0,2% / Ioduro Potásico 0,4%. El color marrón oscuro es indicativo de mayor cantidad de glucógeno. Se muestran datos de un experimento representativo.

Estos resultados indican que el dominio extracelular de Wsc1 se requiere no sólo para la activación de Slt2 y la correspondiente regulación positiva de los genes dependientes de esta MAP quinasa, sino también para producir el efecto inhibitor sobre la ruta cAMP/PKA causado por el tratamiento con caspofungina.

DISCUSIÓN

1. El tratamiento con caspofungina promueve una respuesta transcripcional relacionada con el daño a la pared celular

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en las últimas décadas se ha producido un incremento significativo de infecciones por patógenos fúngicos oportunistas, con una alta tasa de morbilidad. Esta es especialmente elevada en pacientes hospitalarios inmunodeprimidos como consecuencia de infecciones nosocomiales por diferentes especies de *Candida* y *Aspergillus*. Muchos de estos decesos serían evitables con un tratamiento adecuado, que en la actualidad se sustenta fundamentalmente en cuatro tipos de antifúngicos: polienos (como la anfotericina B), azoles (como el itraconazol, fluconazol y el voriconazol), fluocitosina y, los más recientes, las equinocandinas (Mourad & Perfect, 2018). Debido al incremento de resistencias frente a los tres primeros fármacos (Xie *et al*, 2014), así como los efectos adversos que provocan en el paciente (Kullberg *et al*, 2005; Wang *et al*, 2010), las equinocandinas son una importante incorporación al arsenal antifúngico, convirtiéndose en fármacos esenciales en el tratamiento frente a infecciones por *Aspergillus* spp. y fundamentalmente por *Candida* spp. (Mora-Duarte *et al*, 2002; Fisher *et al*, 2018).

Las equinocandinas son lipopéptidos sintéticamente modificados derivados originalmente de procesos fermentativos de diferentes hongos (Masurekar *et al*, 1992; Iwamoto *et al*, 1994). Su mecanismo de acción es la inhibición del complejo β -1,3-glucán sintasa, un complejo enzimático localizado en la membrana plasmática de las células fúngicas implicado en la síntesis de β -1,3-glucano, por lo que la diana de las mismas es la pared celular, lo que confiere a las equinocandinas una actividad antifúngica de amplio espectro (Fera *et al*, 2009). Además, presenta un efecto aditivo en terapias combinadas con otros antifúngicos. Dado que las células de mamíferos carecen de pared celular, estas carecen de diana para las equinocandinas, por lo que los efectos secundarios causados por estos fármacos se ven considerablemente reducidos en relación con el tratamiento con polienos y azoles, cuya diana celular es la membrana plasmática (Wang *et al*, 2015).

Las equinocandinas que actualmente se encuentran en uso clínico son la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina, hexapéptidos cíclicos anfífilos con una cadena lateral aminoácido-lipídica (Bal, 2010). De todas ellas, la caspofungina es la equinocandina más utilizada. Presenta un ácido graso

como cadena lateral, lo que la permite introducirse a través de la bicapa lipídica de la membrana celular (Figura 25). Este fármaco es altamente soluble en agua y metanol y leve en etanol (Kurtz *et al*, 2001). Muestra actividad fungicida frente a diversas especies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusey* y *C. kefyr*, y actividad fungistática frente a especies de *Aspergillus*, como *A. fumigatus*, *A. favus*, y *A. terreus*, además de frente a otras especies de *Candida* como *C. parasilopsis*, *C. guilliermondi* y *C. lusitinae* (Denning, 2002).

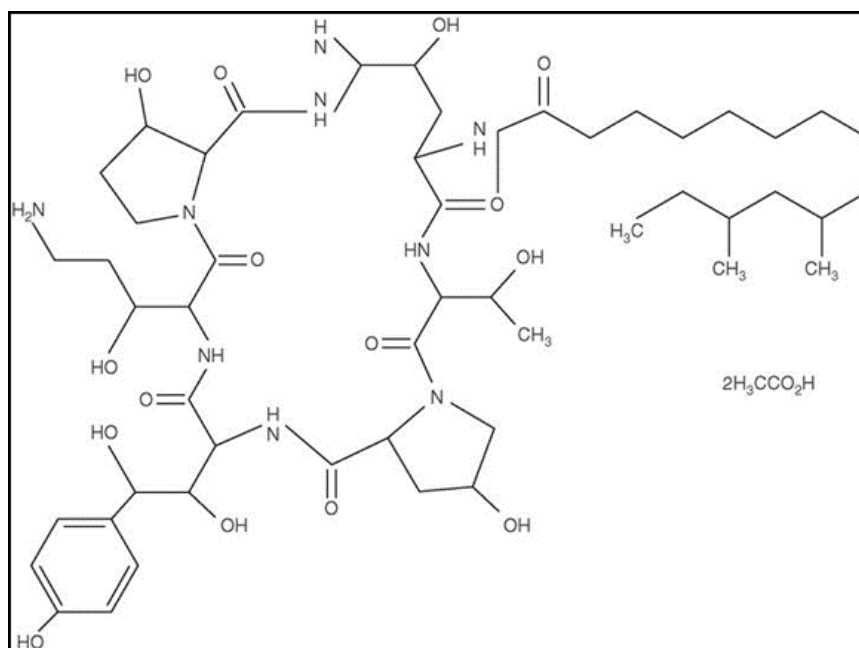


FIGURA 25. Estructura química de la caspofungina

Puesto que el polímero de β -1,3-glucano es un elemento estructural clave en la pared celular fúngica, la inhibición de su síntesis causada por el tratamiento con equinocandinas supone la pérdida de la integridad de la pared, comprometiendo así la supervivencia celular. *Saccharomyces cerevisiae* responde a la presencia de diferentes tipos de estrés activando una serie de respuestas que permiten su supervivencia. La mayoría de estas respuestas están controladas por unas rutas de transducción de señales gobernadas por una MAP quinasa cuya activación da lugar a la fosforilación de los factores de transcripción responsables de la expresión de los genes implicados en dichas respuestas (Chen & Thorner, 2007). Así, la levadura, en respuesta a situaciones que afectan a la integridad de la pared celular, se adapta activando un “mecanismo compensatorio” que supone una serie de cambios en la composición y estructura de la pared con el fin de mantener la viabilidad celular. Entre estos, destacan el aumento del contenido en quitina unido a β -1,6-glucano en la pared celular (Smits *et al*, 2001;

Valdivia & Schekman, 2003), un incremento de manoproteínas presentes en la pared (de Nobel *et al*, 2000; Jung & Levin, 1999) y una redistribución transitoria de la β -1,3-glucan sintasa Fks1 (Delley & Hall, 1999).

Estos cambios requieren la activación transcripcional de una serie de genes que está mediada principalmente por la ruta de integridad celular (CWI), gobernada por la MAP quinasa Slt2 (Levin, 2011). La activación de Slt2 da lugar a la fosforilación del factor de transcripción Rlm1 y su interacción con el complejo de remodelación de cromatina SWI/SNF y con el complejo remodelador de histonas SAGA para dirigir su asociación a los sitios específicos de unión de los promotores de los genes inducidos por la ruta CWI (Levin, 2011; Sanz *et al*, 2012; Sanz *et al*, 2016). Actualmente se dispone de datos transcripcionales de múltiples condiciones de estrés, entre los que se encuentran los asociados con distintos tipos de alteraciones de la integridad de la pared como es por ejemplo el tratamiento con Rojo Congo (Sanz *et al*, 2012), zimoliasa (García *et al*, 2009) y caspofungina (Agarwall *et al*, 2003; Reinoso-Martín *et al*, 2003; Bermejo *et al*, 2010).

Aunque el efecto transcripcional causado por la caspofungina ya se ha descrito con anterioridad utilizando cepas silvestres de la levadura (Agarwall *et al*, 2003; Reinoso-Martín *et al*, 2003; Bermejo *et al*, 2010) aún no está caracterizada la influencia en dicha respuesta de los elementos de la ruta CWI y especialmente del principal componente de la misma, la MAP quinasa Slt2. Así, el objetivo principal de este trabajo era determinar la participación de Slt2 en la respuesta transcripcional consecuencia de la exposición de la levadura a la caspofungina. Teniendo en cuenta que en trabajos anteriores se utilizaron fondos genéticos diversos, drogas de diferentes lotes y plataformas de microarrays de DNA diferentes fue necesario comenzar el trabajo analizando el perfil transcripcional en la cepa silvestre con el objetivo de utilizarlo como referente en los estudios posteriores. De esta manera, utilizando microarrays de DNA de la plataforma Affymetrix, 211 genes mostraron un incremento significativo en sus niveles de expresión en presencia de caspofungina respecto al cultivo control crecido en ausencia de la misma. Este grupo de genes, como era de esperar, incluye prácticamente todos los identificados en los estudios anteriores.

Además también hemos analizado la respuesta transcripcional global frente a la aminocandina, otro miembro de las equinocandinas. La exposición de la levadura a este fármaco induce la expresión de 300 genes, frente a los 211 que se inducen frente a caspofungina. Existe un fuerte solapamiento entre ambas

respuestas, ya que de los 211 genes inducidos frente a caspofungina, 189 están incluidos en el grupo de los 300 genes que se inducen en presencia de aminocandina. De igual forma, existe también una elevada similitud entre los principales grupos funcionales asociados a los genes inducidos frente a cada una de las respuestas, siendo en ambos casos predominantes los relacionados con la respuesta a estrés, el transporte, la biogénesis de la pared celular y el metabolismo. Además, la respuesta frente a aminocandina es, al igual que en el caso de la caspofungina (Bermejo *et al*, 2010), dependiente del sensor de la ruta de integridad celular Wsc1. Todo ello indica que el efecto transcripcional inducido por ambas equinocandinas es consecuencia de la inhibición del complejo β -1,3-glucán sintasa.

El análisis comparativo de los perfiles transcripcionales previamente descritos frente al tratamiento con otros agentes que alteran la pared celular, como el Rojo Congo o la zimoliasa respecto al de la caspofungina, reveló la inducción común de 32 genes en las tres respuestas, lo que sugiere la importancia de estos en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Dentro de este grupo de genes, 9 de ellos (*PIR3*, *CWP1*, *PST1*, *YPS3*, *YPS6*, *YLR194C*, *GFA1*, *PUN1* y *CRH1*) están funcionalmente relacionados con la construcción de la pared celular y 5 con la transducción de señales (*SLT2*, *MLP1*, *AFR1*, *PTP2* y *NQM1*). Respecto a los genes de pared celular cabe destacar la inducción de *GFA1*, necesario para la síntesis de N-acetil-glucosamina (Lagorce *et al*, 2002), y *CRH1*, que codifica para la transglicosilasa Crh1, implicada en el ensamblaje entre la quitina y el glucano (Rodríguez-Peña *et al*, 2000; Cabib *et al*, 2009). La inducción de ambos genes está relacionada con el aumento de la cantidad de quitina, fenómeno asociado al mecanismo compensatorio. La inducción de *SLT2* en presencia de los tres compuestos está relacionada con el mecanismo de retroalimentación positivo que promueve un incremento de la expresión tanto del propio gen *RLM1* como del gen *SLT2* (Martín *et al*, 2000; García *et al*, 2016). En la profundización del análisis comparativo entre los perfiles transcripcionales obtenidos frente a los tres compuestos se observa, adicionalmente al grupo común de genes, también la inducción de tres conjuntos de genes de forma específica frente a cada uno de estos agentes. Este fenómeno sugiere que frente a distintos tipos de daño sobre la pared celular se produce una respuesta específica de estímulo. Además, debe tenerse en cuenta que el mecanismo de señalización a nivel extracelular para el efecto de la caspofungina (sensor Wsc1), el Rojo Congo (sensor) y la zimoliasa (rama Hkr1/Sho1 de la ruta HOG) es diferente (Bermejo *et al*, 2010; García *et al*, 2009; Rodríguez-Peña *et al*, 2013). Es importante destacar que el grado de correlación entre los estudios

transcripcionales y fenotípicos utilizando caspofungina es bastante bajo. Así, de las 211 cepas delecionadas individualmente en cada uno de los genes cuya expresión se ve incrementada en presencia de caspofungina, solo 13 mostraron sensibilidad a este fármaco (García *et al*, 2015). Este fenómeno se observa también en el caso del Rojo Congo y la zimoliasa, apoyando la idea de que las respuestas efectoras son importantes en la respuesta adaptativa global pero no son elementos esenciales de forma individual para la supervivencia celular en presencia de estrés.

La ausencia de fosforilación de Slt2 en presencia de caspofungina en las cepas mutantes *wsc1Δ*, *rom2Δ*, *mkk1/2Δ* y *bck1Δ* indica que está mediada desde el sensor Wsc1 vía Rom2 hasta la MAP quinasa por los componentes habituales de la ruta CWI. La importancia de la activación de la ruta CWI para la supervivencia de la célula en presencia de caspofungina se ha puesto de manifiesto por la hipersensibilidad frente a este compuesto que muestran mutantes afectados en la ruta como *rom2Δ*, *mkk1/2Δ*, *bck1Δ* o *slt2Δ*. Un comportamiento distinto al esperado es el del mutante en el sensor Wsc1, que presenta una resistencia frente al fármaco superior a la cepa silvestre, fenómeno que había sido demostrado en estudios previos en los que se utilizó el mismo fondo genético que en el presente trabajo (Lesage *et al*, 2004; Markovich *et al*, 2004). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este mismo estudio fenotípico realizado en un fondo genético diferente, HAS7, muestra un nivel de hipersensibilidad frente a caspofungina en una cepa delecionada en *WSC1* similar al de cepas delecionadas en otros elementos de la ruta CWI (Straede & Heinisch, 2007).

2. Los genes regulados de forma independiente de Slt2 en respuesta a caspofungina son dianas de la ruta cAMP/PKA

En el presente trabajo se ha comprobado que solo 72 genes (34,1%) sobre el total de 211 que se inducen frente a caspofungina son dependientes de Slt2, mientras que la activación los 139 restantes (65,9%) es independiente de la MAP quinasa, lo que indica la posibilidad de la implicación de otras rutas en la señalización del daño en la pared causado por la caspofungina. De forma contraria a lo observado en el grupo de los 72 genes cuya inducción es dependiente de Slt2, en el grupo de los 139 independientes de la MAP quinasa el número de genes asociados a la biogénesis de la pared celular y a la transducción de señales es minoritario. Son genes relacionados con la respuesta

a estrés general, el transporte, el metabolismo y la obtención de energía los que aparecen más representados en esta parte de la respuesta. Además, y también de forma opuesta a lo observado en el primer grupo de genes, el grado de solapamiento observado entre estos 139 genes independientes de Slt2 con el grupo de genes inducidos en presencia de Rojo Congo o zimoliasa es más limitado.

El análisis bioinformático de la respuesta transcripcional a caspofungina independiente de Slt2 permitió identificar un amplio grupo de genes cuya regulación está asociada a la ruta cAMP/PKA, la principal ruta implicada en la regulación del control de nutrientes (Thevelein & de Winde, 1999; Broach, 2012; Conrad *et al*, 2014), lo que explicaría la relación de un buen número de estos genes con metabolismo, transporte y obtención de energía. De hecho, la activación constitutiva de PKA provoca la represión de este conjunto de genes (GEO: GSE8805; Carter *et al*, 2006). De forma opuesta, la inducción de la expresión de los mismos se produce en condiciones de inhibición de la ruta cAMP/PKA, como son la ausencia de glucosa o la entrada en fase estacionaria (Bradley *et al*, 2009; Gasch *et al*, 2000).

Además, más del 90% de este subgrupo de genes presenta en su región promotora sitios STRE, motivos de unión de los factores de transcripción Msn2/4, que a su vez están regulados por la ruta cAMP/PKA. En condiciones de inhibición de esta ruta, las subunidades reguladoras de PKA, Bcy1, se unen a las subunidades catalíticas, bloqueando su actividad quinasa sobre sus dianas, entre las que se encuentran tanto Msn2/4 como la proteína quinasa Rim15, que a su vez actúa sobre estos factores de transcripción (Martínez-Pastor *et al*, 1996; Lee *et al*, 2013). Así, en ausencia de fosforilación, Msn2/4 migra desde el citoplasma al núcleo donde se une a las secuencias STRE y activa la expresión de genes relacionados con respuesta a estrés (Cameroni *et al*, 2004; Jacquet *et al*, 1997). El tratamiento con caspofungina parece mimetizar este fenómeno, puesto que la proteína de fusión Msn2-GFP incrementa su localización nuclear en presencia del antifúngico.

Sin embargo, pese al alto número de genes con motivos STRE en sus promotores que componen la respuesta a caspofungina independiente de Slt2, el perfil transcripcional global obtenido en presencia de este fármaco en el doble mutante *msn2/4Δ* indica que estos factores de transcripción son responsables de la inducción de sólo un reducido subgrupo de genes, que corresponde a poco más del 20% de esta parte de la respuesta. Ello sugiere la participación de otros

factores de transcripción dependientes a su vez de la inhibición de la ruta cAMP/PKA en la regulación de la respuesta. Entre los factores de transcripción regulados por esta ruta se encuentran, además de Msn2/4, Rph1 y Gis1 (Orzechowski Westholm *et al*, 2012; Pedruzzi *et al*, 2000), que regulan genes asociados a la fase post-diáuxica y a la entrada en fase estacionaria. En concreto Rph1 está implicado en la regulación de genes asociados a la fase estacionaria temprana, tras la salida de la fase post-diáuxica, y al igual que Msn2/4, reconoce el motivo STRE de las regiones promotoras de los genes de cuya inducción es responsable (Jang *et al*, 1999; Orzechowski Westholm *et al*, 2012). Así, la actividad de Rph1 podría explicar la presencia del alto número de genes con secuencias STRE cuya transcripción en respuesta a caspofungina o no es dependiente de Msn2/4 o bien su inducción responde a un fenómeno de coregulación por Rph1 y Msn2/4.

El factor de transcripción Gis1, también controlado por la ruta cAMP/PKA a través de Rim15 (Cameroni *et al*, 2004; Swinnen *et al*, 2013), regula la expresión de genes relacionados con la fase post-diáuxica (Pedruzzi *et al*, 2000; Orzechowski Westholm *et al*, 2012). Los genes regulados por este factor de transcripción presentan en sus regiones promotoras motivos PDS, que presentan una elevada similitud con los motivos STRE reconocidos por Msn2/4 y Rph1, y presentes en los promotores del 37% de genes independientes de Slt2 y no regulados por Msn2/4. Además debe tenerse en cuenta que Rph1 y Gis1 regulan de forma sinérgica o redundante un considerable número de genes asociados a la salida de la fase postdiáuxica (Orzechowski Westholm *et al*, 2012), y que durante la transición diáuxica existe un conjunto de genes regulados de forma cooperativa por Gis1 y Msn2/4 (Cameroni *et al*, 2004), generándose una compleja red reguladora relacionada con la carencia de nutrientes.

Además, el incremento de sensibilidad a caspofungina que muestra el doble mutante *msn2/4Δ* en relación con la cepa silvestre es similar al observado en el doble mutante *pde1/2Δ*. Este resultado sugiere que la ausencia de la inducción de la expresión de los genes dependientes de Msn2/4 es la responsable del fenotipo de hipersensibilidad frente al fármaco. Estos datos fenotípicos indican que pese a que desde un punto de vista cuantitativo el número de genes regulados por Msn2/4 en respuesta a caspofungina es poco más del 20%, cualitativamente la implicación de este factor de transcripción es importante. De hecho, el incremento de sensibilidad es equivalente al observado en cepas delecionadas en ciertos elementos de la ruta de integridad celular, como Rom2,

Bck1 y Mkk1/2, pero sin llegar al efecto observado en la cepa carente de la MAP quinasa Slt2.

3. La caspofungina induce la inhibición de la ruta cAMP/PKA afectando a la activación de Ras2

Desde un punto de vista mecanístico, los resultados de este trabajo permiten proponer la secuencia de eventos a través de los cuales la caspofungina ejerce el efecto inhibitorio sobre la ruta cAMP/PKA responsable de la respuesta transcripcional independiente de Slt2. Así, el estudio del nivel de la actividad de PKA *in vivo* reveló que el tratamiento con caspofungina induce la inhibición de esta proteína de forma dependiente de Wsc1. Además, la cuantificación de los niveles de AMP cíclico intracelular ha puesto de manifiesto que la inhibición de PKA en presencia del fármaco viene mediada por un descenso significativo de la cantidad de este nucleótido en el citoplasma. Teniendo en cuenta que la enzima adenilato ciclasa (AC), responsable de la síntesis del AMPc intracelular, es activada por las proteínas Ras (Colombo *et al*, 1998) se estudió el nivel de activación de Ras2 en presencia y ausencia de caspofungina, poniendo de manifiesto que la presencia de esta droga en el medio induce la conversión de Ras2-GTP, la forma activa de la proteína, en Ras2-GDP. De esta forma, la presencia de caspofungina en el medio provoca la inactivación de Ras2, con el consiguiente descenso en los niveles de AMPc intracelular y la inhibición de PKA. En relación a cómo el efecto de la caspofungina a nivel de la superficie celular, señalado a través del sensor Wsc1, se traduce en la inactivación de Ras2, diversos trabajos publicados han demostrado que la variación del pH intracelular debido al metabolismo de la glucosa actúa como señal para la activación de las proteínas Ras, a través de la ATPasa vacuolar (ATPasa-V) mediado por la GTPasa Arf1 (Dechant *et al*, 2010; Dechant *et al*, 2014). Además, se ha planteado la hipótesis según la cual a través de la modulación del pH citosólico se integran diferentes señales generadas por diferentes estreses ambientales con el objetivo de contribuir a la adaptación celular al estrés. De hecho, el estrés oxidativo inducido por agua oxigenada reduce rápidamente el pH citosólico (Dechant & Peter, 2014). Los resultados obtenidos en el presente estudio son compatibles con este planteamiento, donde la modulación de la actividad de Ras2 y PKA mediada por caspofungina se produciría a través de la variación del pH citosólico y conduciría a la adaptación de la célula a la presencia del fármaco. El hecho de que el descenso del pH citosólico en presencia de caspofungina no se ve afectado en el doble mutante *pde1/2Δ*, en el cual la ruta cAMP/PKA está

hiperactivada, permite descartar la posibilidad de que esta variación de pH sea consecuencia de un efecto secundario debido a la inhibición de PKA

Es importante destacar que el efecto temporal de la caspofungina sobre la inhibición de PKA, tanto a nivel de potenciales dianas de la misma como es la proteína Pat1, analizada en nuestro estudio, como en relación al efecto sobre la translocación nuclear del factor de transcripción Msn2, sigue un patrón de activación similar al de la ruta de integridad celular, alcanzando el pico máximo tras alrededor de dos horas de exposición. Este dato es coherente con el hecho de que todo el efecto observado sobre la ruta cAMP/PKA depende de la presencia del sensor Wsc1. Sin embargo, contrasta con la dinámica de localización nuclear de Msn2 observada en las respuestas frente a otros estreses regulados por este factor de transcripción. Por un lado, la translocación al núcleo de Msn2 es más rápida en respuesta a la ausencia de glucosa, choque térmico, presencia de etanol, o una elevada presión osmótica que frente a caspofungina (Görner et al, 1997). Además, en respuesta a estrés oxidativo (Petkova *et al*, 2010) y en condiciones de alcalinidad (Casado *et al*, 2011) la población celular con Msn2 localizado en el núcleo es considerablemente mayor que frente a caspofungina. Así, se ha propuesto que las células modulan la dinámica de translocación nuclear de Msn2/4 en función de la intensidad del estrés (Hao & O'Shea, 2011). Por tanto se puede concluir que el daño sobre la pared celular causado por la caspofungina provoca un patrón específico de translocación al núcleo de Msn2, más tardío y de menor amplitud que el observado frente a otras condiciones de estrés descritas.

4. El tratamiento con caspofungina pone de manifiesto una nueva conexión entre las rutas CWI y cAMP/PKA

El hecho de que la parte de la respuesta transcripcional regulada por la inhibición de la ruta cAMP/PKA sea, al igual que la parte regulada por la MAP quinasa de la ruta CWI Slt2, dependiente del sensor Wsc1 indica la existencia de una interacción entre ambas rutas en respuesta al tratamiento con casofungina, de modo que el tratamiento con este fármaco induce, a través de este sensor, tanto la activación de la ruta CWI como la inhibición de la ruta cAMP/PKA.

La disponibilidad en nuestro laboratorio de cepas de levadura que expresan versiones quiméricas de los principales sensores de la ruta CWI, Wsc1 y Mid2, donde la región extracelular de Wsc1 está fusionada a la región citoplásmica de

Mid2 (*WSC1_{ex}MID2_{cit}*) y viceversa (*MID2_{ex}WSC1_{cit}*), han permitido poner de manifiesto que la sustitución de la región extracelular de Wsc1 por la parte extracelular de Mid2 da lugar a un sensor híbrido incapaz de responder a la presencia de caspofungina, de tal forma que la cepa que expresa esta construcción se comporta como un mutante *wsc1Δ*, donde no se produce la acidificación del citosol en respuesta al fármaco. Por el contrario, en la cepa que expresa la quimera *WSC1_{ex}MID2_{cit}* el descenso del pH observado en respuesta a caspofungina es similar al de la cepa silvestre. Este resultado concuerda con estudios previos que indican que la especificidad de Wsc1 para activar la ruta CWI en presencia de este fármaco depende del dominio extracelular de este sensor (Bermejo *et al*, 2010). En la misma línea, la acumulación de glucógeno, indicadora de la inhibición de PKA, en respuesta a caspofungina se encuentra también bloqueada únicamente en la cepa quimérica que expresa la región extracelular de Mid2.

Wsc1 se localiza fundamentalmente en sitios de crecimiento, desde donde contribuye a coordinar la respuesta a variaciones en la pared celular a través de Rho1, activando la β -1,3-glucán sintasa y la ruta CWI, reciclándose de forma rápida por endocitosis y siendo además el dominio citoplasmático el responsable del patrón de localización del sensor (Levin, 2005; Piao *et al*, 2007). Como conclusión, tanto la activación de la ruta de integridad celular como la inhibición de la ruta cAMP/PKA frente al daño en la pared causada por este antifúngico está señalizada por la región extracelular del sensor Wsc1.

Estudios previos a este trabajo han determinado la interacción entre la ruta de integridad celular (CWI) y la ruta cAMP/PKA a través de diferentes elementos de ambas rutas (Figura 26). La sobreexpresión de *WSC1* suprime la sensibilidad observada frente al choque térmico en condiciones de hiperactivación de Ras (Verna *et al*, 1997). Además, la delección de *RAS2* rescata el fenotipo de hipersensibilidad frente al choque térmico observado en el mutante *wsc1Δ* (Verna *et al*, 1997). Ambos fenómenos sugieren que en condiciones de estrés térmico Wsc1 puede actuar o bien modulando la actividad AC o bien directamente sobre la proteína PKA. Otros estudios (Park *et al*, 2005) han determinado una conexión adicional entre la ruta CWI y la ruta cAMP/PKA donde está implicada la GEF de Rho1 Rom2. La sobreexpresión de *ROM2* suprime el fenotipo de sensibilidad frente al choque térmico y la alta presión osmótica observado en las cepas delecionadas en los genes de las fosfodiesterasas *PDE1* y *PDE2* y de la GTPasa de Ras *IRA2*. Además, la hipersensibilidad frente a

diferentes estreses como agua oxigenada, cicloheximida, NaCl o iones de cobalto observada en el mutante *rom2Δ* se revierte al sobreexpresar *PDE2* o al reducir las actividades de Ras2 o de PKA. En esta misma línea, se detectó un aumento en los niveles de AMPc en esta cepa mutante, de tal forma que Rom2 estaría regulando la actividad de PKA modulando los niveles de AMPc intracelular a través de Ras2 (Park *et al*, 2005) (Figura 26).

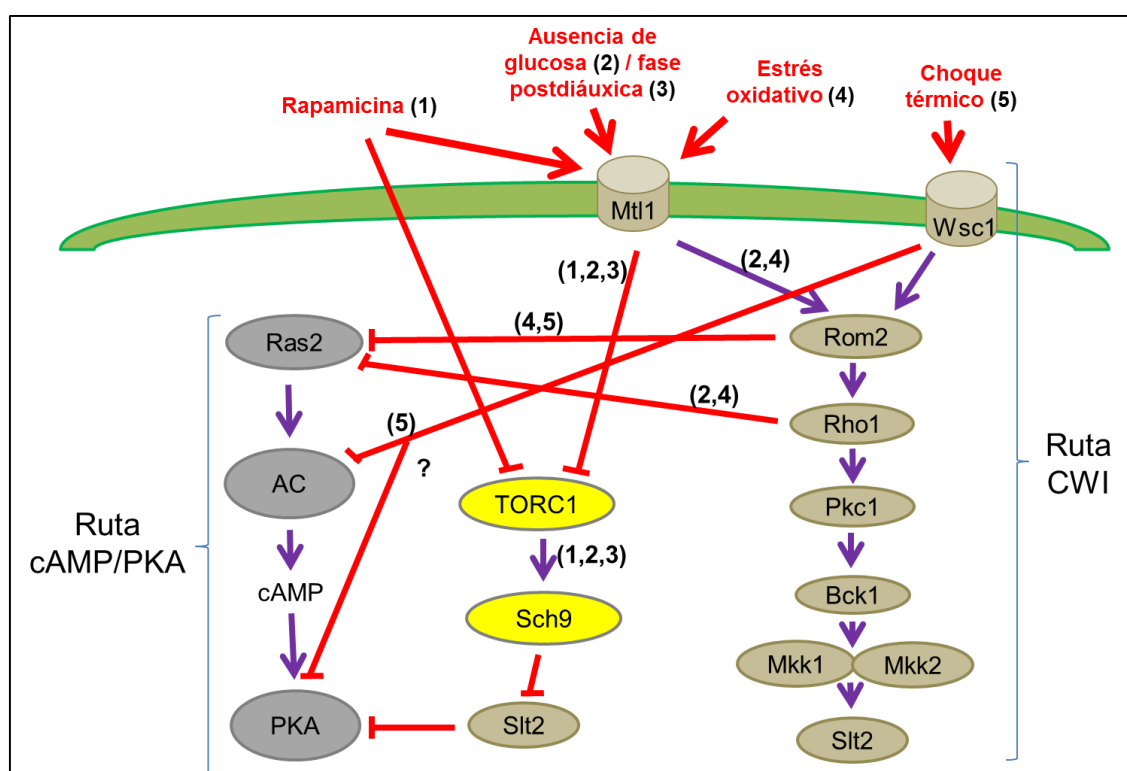


FIGURA 26. Descripción esquemática de las interacciones descritas entre las rutas CWI y cAMP/PKA. Los números señalados entre paréntesis hacen referencia a cada uno de los estreses sobre la pared celular frente a los que se ha descrito una conexión entre ambas rutas.

Otros estudios también han puesto de manifiesto la conexión desde un nivel inferior de los sensores de la ruta CWI hacia la ruta cAMP/PKA. Así, la hiperactivación de la GTPasa Rho1, que transmite la señal desde los sensores de la ruta CWI hasta la proteína quinasa Pkc1, permite recuperar parcialmente la expresión de genes dependientes de *Msn2/4* cuya inducción en respuesta a peróxido de hidrógeno se encuentra bloqueada en el mutante *mtl1Δ* (Petkova *et al*, 2010). Además, la ausencia de Ras2 y Tor1 también permite recuperar parcialmente en el mutante *mtl1Δ* la expresión de genes de respuesta al peróxido de hidrógeno y rapamicina. De esta forma, se ha propuesto un modelo según el cual en respuesta a estrés oxidativo, además de en condiciones ausencia de glucosa, se produce la inhibición de Ras2 a través de Rho1 de forma dependiente del sensor Mtl1 (Petkova *et al*, 2010). Sin embargo, en el presente

trabajo se ha demostrado que en respuesta a caspofungina la pérdida de Rom2, Bck1, Slt2 y Rlm1 no bloquea los fenómenos asociados a la inhibición de PKA, como son la translocación nuclear de Msn2 y la acumulación de glucógeno. De esta forma, nuestros resultados sugieren la existencia de una nueva conexión entre la ruta CWI y la ruta cAMP/PKA que se produce de forma dependiente del sensor Wsc1 e independiente de Rom2, y probablemente, de Rho1.

Además, diversos trabajos han demostrado que en condiciones nutricionales favorables y en ausencia de estrés, *TORC1* fosforila Sch9 y esta proteína quinasa a su vez inhibe la MAP quinasa de la ruta CWI Slt2, que en su forma activada está implicada en una inhibición de PKA mediante la fosforilación y activación de la subunidad reguladora Bcy1. Bajo determinadas circunstancias, como es el tratamiento con rapamicina, la inhibición de *TORC1* y la consiguiente inhibición de Sch9 permite la fosforilación y activación de Slt2, condición en la cual esta MAP quinasa ejerce un efecto inhibitorio sobre PKA (Soulard *et al*, 2010). Así, la activación de Slt2 en presencia de rapamicina está mediada por la proteína quinasa Sch9 a través de la inhibición de *TORC1*. Un efecto parecido se ha descrito en condiciones de ausencia de glucosa y entrada en fase postdiáuxica, aunque en este caso la inhibición de *TORC1* es señalizada por el sensor de la ruta CWI Mtl1 (Sundaram *et al*, 2015) (Figura 26). Por el contrario, en el caso de la caspofungina, la respuesta transcripcional asociada a PKA, así como la localización subcelular de Msn2 y la acumulación de glucógeno, parámetros indicadores del estado de PKA, no están afectados en un mutante *slt2Δ*.

Cabe destacar que otros estreses sobre la célula como el crecimiento en medio alcalino (Casado *et al*, 2011) y el estrés sobre el retículo endoplasmático (Pincus *et al*, 2014) también inducen la inhibición de la ruta cAMP/PKA a través de mecanismos aún no caracterizados. Además, en *Cryptococcus neoformans* la comparación de las respuestas transcripcionales globales en cepas delecionadas en los genes que codifican para Pkc1, Bck1, Mkk2 y Slt2 con la observada en la cepa silvestre, ha permitido observar la expresión diferencial de un gran grupo de genes, muchos de los cuales se han identificado como genes regulados a través de la ruta cAMP/PKA. Adicionalmente, la medición del nivel del AMPc intracelular en los mutantes analizados reveló un descenso significativo de este nucleótido respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere la existencia de una conexión entre la ruta CWI y la ruta cAMP/PKA (Donlin *et al*, 2014). Sin embargo el descenso del nivel de AMPc intracelular en cepas delecionadas en elementos de la ruta CWI sugiere que en *C. neoformans* esta ruta está implicada en la activación de la ruta cAMP/PKA, fenómeno distinto al

observado en nuestro trabajo con *S. cerevisiae*, donde en respuesta a caspofungina se produce la activación de la ruta CWI y la inhibición de la ruta cAMP/PKA, siendo ambos fenómenos dependientes del sensor Wsc1 (Figura 27).

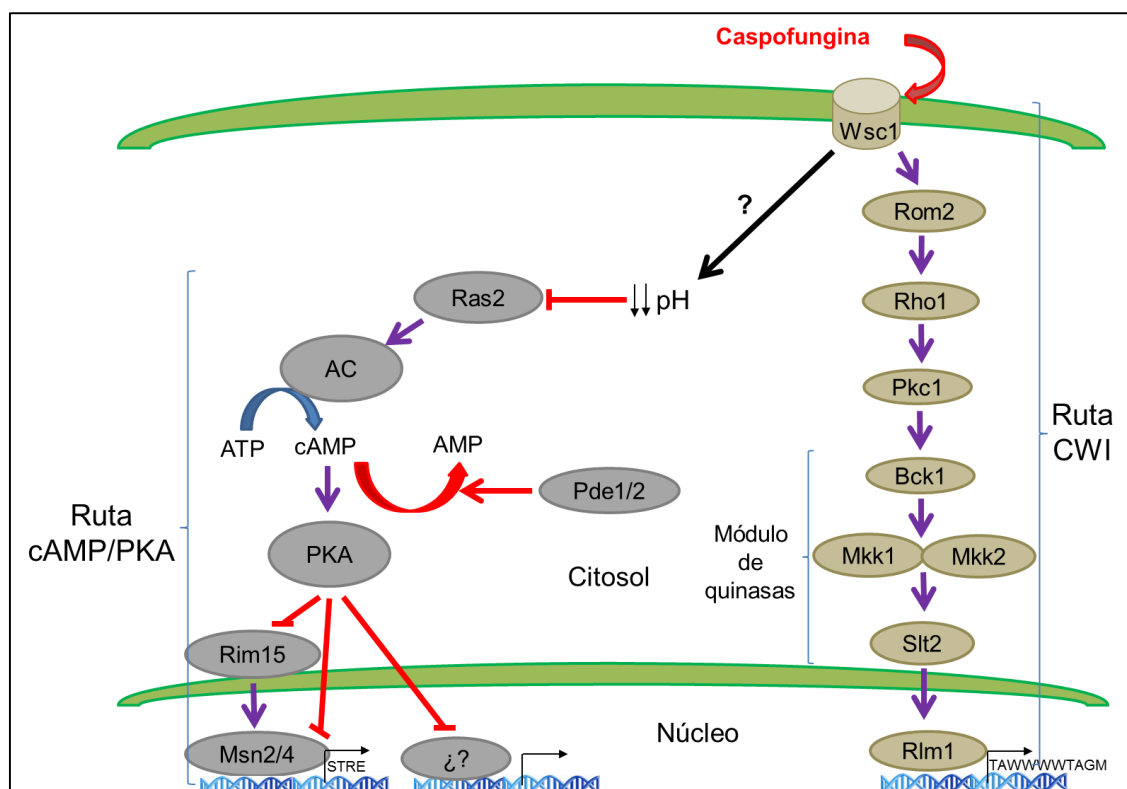


FIGURA 27. Modelo propuesto de la regulación de la respuesta transcripcional frente a caspofungina.

La participación de la ruta cAMP/PKA en la regulación del crecimiento en base a las diferentes condiciones ambientales que rodean a la célula está ampliamente conservada en los organismos eucariotas. Debido a la naturaleza pleiotrópica de la ruta cAMP/PKA los estudios moleculares sobre los procesos regulados por esta vía, tales como el realizado en el presente trabajo, conllevan una gran complejidad en cuanto a su interpretación. Sin embargo, esta naturaleza pleiotrópica y su capacidad para afectar de forma simultánea múltiples procesos fisiológicos necesarios para la virulencia de hongos patógenos hace de la ruta cAMP/PKA una diana potencial de antifúngicos (Fuller & Rodes, 2012). De hecho, esta ruta participa en la regulación de los procesos de morfogénesis (tales como germinación o formación de esporas), de resistencia frente a las defensas del huésped (como la formación de cápsulas o la biosíntesis de melanina) y de adaptación metabólica o de respuesta a estrés en *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans* (Fuller & Rodes, 2012). Por tanto, es

factible que una terapia combinada por un lado afectando la actividad o regulación de la ruta cAMP/PKA, y por otro a la integridad de la pared celular pudiera ser una alternativa terapéutica útil para combatir las infecciones fúngicas, principalmente en el caso de las cepas resistentes a los tratamientos convencionales.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son:

1. Las alteraciones en la red de β -1,3 glucano de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* mediadas por caspofungina inducen, a través de Wsc1, la activación de la ruta de integridad celular (CWI) y la inhibición paralela de la señalización a través de la ruta cAMP/PKA.
2. La inhibición de la síntesis de β -1,3-glucano mediada por caspofungina induce la activación transcripcional de 211 genes, asociados fundamentalmente a la respuesta a estrés, transporte, metabolismo, transducción de señales y mantenimiento de la integridad de la pared celular.
3. Esta respuesta transcripcional se encuentra bloqueada en una cepa carente del sensor Wsc1 e incluye un grupo de genes Slr2 dependientes (34,1%) y otro de genes Slr2 independientes (65,9%). Este último incluye principalmente genes cuya expresión se induce en condiciones de inhibición de la ruta cAMP/PKA.
4. La caspofungina activa la MAP quinasa de la ruta CWI Slr2 de forma dependiente del sensor Wsc1, de la GEF de Rho1 Rom2, así como de elementos del módulo de MAP quinasas (Mkk1/2 y Bck1). En consecuencia la activación transcripcional de genes Slr2 dependientes depende de Wsc1, de Rom2 y del factor de transcripción Rlm1.
5. La inducción por caspofungina de la expresión de genes Slr2 independientes como *ALD3*, *CCT1* y *HXT5* está bloqueada en cepas carentes de Bcy1, Pde1/Pde2, Msn2/4 o Rim15, lo que sugiere que dicha inducción está asociada a una regulación negativa de la señalización a través de la ruta cAMP/PKA.
6. La ausencia de los factores de transcripción Msn2/4 afecta a los niveles de expresión de un 21% del grupo de genes Slr2 independientes, apoyando la idea de que otros factores regulados por PKA participan de forma coordinada en la respuesta.
7. Situaciones de estrés sobre la pared celular inducidas por caspofungina y no por otros agentes que también interfieren con la construcción de la pared celular inducen la inhibición de la actividad de la ruta cAMP/PKA. Dicha inhibición está mediada por un descenso significativo de los niveles de AMPc intracelular, como

Conclusiones

consecuencia de la inactivación de Ras2. Además, la caspofungina induce una disminución del pH citosólico, fenómeno que podría estar asociado a la inactivación de Ras2.

8. La región extracitoplásmica del sensor Wsc1 es la responsable no solo de detectar el daño causado por la caspofungina con la correspondiente activación de los genes dependientes de la ruta CWI, sino también del efecto inhibitorio sobre la ruta cAMP/PKA y la disminución del pH citosólico mediado por esta droga.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamo,J.E., Moskow,J.J., Gladfelter,A.S., Viterbo,D., Lew,D.J., Brennwald,P.J. (2001) Yeast Cdc42 functions at a late step in exocytosis, specifically during polarized growth of the emerging bud. *J Cell Biol.* **155**: 581-592.
- Agarwal,A.K., Rogers,P.D., Baerson,S.R., Jacob,M.R., Barker,K.S., Cleary,J.D., Walker,L.A., Nagle,D.G., Clark,A.M. (2003) Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **278**: 34998-35015.
- Aguilar-Uscanga,B., François,J.M. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol.* **37**: 268-274.
- Ahuatzi,D., Herrero,P., de la Cera,T., Moreno,F. (2004) The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J Biol Chem.* **279**: 14440–14446.
- Alberts,A.S., Bouquin,N., Johnston,L.H., Treisman,R. (1998) Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem.* **273**: 8616-8622.
- Amigoni,L., Martegani,E., Colombo,S. (2013) Lack of *HXK2* induces localization of active Ras in mitochondria and triggers apoptosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid Med Cell Longev.* **2013**: 678473.
- Arroyo,J., Bermejo,C., Garcia,R., Rodriguez-Peña,J.M. (2009) Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Clin Microbiol Infect.* **15**: 44-46.
- Ausubel,F.M., Kingston,R.E., Brent,R., Moore,D.D., Seidman,J.G., Smith,S.A., Struhl, K. (1993) Current Protocols in Molecular Biology. New York: *Greene Publishing Associates and Wiley Interscience*.
- Bal,AM. (2010) The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**: 13–18.
- Baladron,V., Ufano,S., Duenas,E., Martin-Cuadrado,A.B., del Rey, F., Vazquez de Aldana,C.R. (2002) Eng1p, an endo-1,3-beta-glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **1**: 774-786.
- Bar,E.E., Ellicott,A.T., Stone,D.E. (2003) Gβγ recruits Rho1 to the site of polarized growth during mating in budding yeast. *J Biol Chem.* **278**: 21798-21804.
- Bardwell,L. (2005) A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26**: 339-350.
- Barrett,L., Orlova,M., Maziarz,M., Kuchin,S. (2012) Protein kinase A contributes to the negative control of Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* **11**: 119-28.
- Belotti,F., Tisi,R., Paiardi,C., Groppi,S., Martegani,E. (2011) PKA-dependent regulation of Cdc25 RasGEF localization in budding yeast. *FEBS Lett.* **585**: 3914–3920.
- Belotti,F., Tisi,R., Paiardi,C., Rigamonti,M., Groppi,S., Martegani,E. (2012) Localization of Ras signaling complex in budding yeast. *Biochim Biophys Acta.* **1823**:1208-1216.
- Bermejo,C., García,R., Straede,A., Rodríguez-Peña,J.M., Nombela,C., Heinisch,J.J., Arroyo,J. (2010) Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of Wsc1 and Mid2 deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* **14**: 679-688.
- Bermejo,C., Rodriguez,E., Garcia,R., Rodriguez-Peña,J.M., Rodriguez de la Concepcion ML, Rivas,C. et al. (2008) The sequential activation of the yeast HOG and Slt2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**: 1113-1124.

- Bernard,A., Jin,M., González-Rodríguez,P., Füllgrabe,J., Delorme-Axford,E., Backues,S.K., Joseph,B., Klionsky,D.J. (2015) Rph1/KDM4 mediates nutrient-limitation signaling that leads to the transcriptional induction of autophagy. *Curr Biol.* **25**: 546-555.
- Bi,E., Park,H.O. (2012) Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* **191**: 347–387.
- Bontron,S., Jaquenoud,M., Vaga,S., Talarek,N., Bodenmiller,B., Aebersold,R., de Virgilio,C. (2013) Yeast endosulfines control entry into quiescence and chronological life span by inhibiting protein phosphatase 2A. *Cell Rep.* **3**: 16-22.
- Boorsma,A., de Nobel,H., Ter,R.B., Bargmann,B., Brul,S., Hellingwerf,K.J., Klis,F.M. (2004) Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 413-427.
- Boy-Marcotte,E., Garmendia,C., Garreau,H., Lallet,S., Mallet,L., Jacquet,M. (2006) The transcriptional activation region of Msn2p, in *Saccharomyces cerevisiae*, is regulated by stress but is insensitive to the cAMP signalling pathway. *Mol Genet Genomics* **275**: 277–287.
- Boy-Marcotte,E., Ikononi,P., Jacquet,M. (1996) Sdc25, a dispensable Ras guanine nucleotide exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae* differs from Cdc255 by its regulation. *Mol Biol Cell* **7**: 529–539.
- Bradley,P.H., Brauer,M.J., Rabinowitz,J.D., Troyanskaya,O.G. (2009) Coordinated concentration changes of transcripts and metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000270.
- Brauer,M.J.,C. Huttenhower,E.M., Airoidi,R., Rosenstein,Matese,J.C., Gresham, D, Boer, V.M., Troyanskaya,O.G.,Botstein,D, (2008) Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. *Mol. Biol. Cell* **19**: 352–367.
- Brett,C.L., Tukaye,D.N., Mukherjee,S., Rao,R. (2005) The yeast endosomal Na⁺ K⁺/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Molecular biology of the cell* **16**: 1396–1405.
- Broach,J.R., Deschenes,R.J. (1990) The function of ras genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Cancer Res.* **54**: 79-139.
- Broach,J.R. (2012) Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* **192**: 73-105.
- Broek,D., Samiy,N., Fasano,O., Fujiyama,A., Tamanoi,F., Northup,J., Wigler,M. (1985) Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins. *Cell* **41**: 763-769.
- Broek,D., Toda,T., Michaeli,T., Levin,L., Birchmeier,C., Zoller,M., Powers,S., Wigler,M. (1987) The *S. cerevisiae* Cdc25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* **48**: 789–799.
- Broggi,S., Martegani,E., Colombo,S. (2013) Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP shows predominant Ras activation at the plasma membrane and in the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Biochem Cell Biol.* **45**: 384–394.
- Brown,J.L., Bussey,H., Stewart,R.C. (1994) Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two component regulatory pathway. *EMBO J* **13**: 5186-5194.
- Budhwar,R., Lu,A., Hirsch, J.P. (2010) Nutrient control of yeast PKA activity involves opposing effects on phosphorylation of the Bcy1 regulatory subunit. *Mol. Biol. Cell* **21**: 3749–3758.
- Buehrer,B.M., Errede,B. (1997) Coordination of the mating and cell integrity mitogenactivated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **17**: 6517-6525.

- Buschlen,S., Amillet,J.M., Guiard,B., Fournier,A., Marcireau,C., Bolotin-Fukuhara,M. (2003) The *S. cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comparative and Functional Genomics Comp Funct Genom.* **4**: 37–46.
- Cabib,E. (2009) Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both beta(1-6)- and beta(1-3)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Eukaryot Cell* **8**: 1626-1636.
- Cabib,E., Arroyo,J. (2013) How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat Rev Microbiol.* **11**: 648-655.
- Cabib,E., Blanco,N., Grau,C., Rodriguez-Pena,J.M., Arroyo,J. (2007) Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **63**: 921-935.
- Cabib,E., Bowers,B., Roberts,R.L. (1983) Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci.* **80**: 3318-3321.
- Cabib,E., Duran,A. (2005) Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J Biol Chem.* **280**: 9170-9179.
- Cabib,E., Roh,D.H., Schmidt,M., Crotti,L.B., Varma,A. (2001) The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem.* **276**: 19679-19682.
- Cabib,E., Silverman,S.J., Shaw,J.A. (1992) Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* **138**: 97-102.
- Cameroni,E., Hulo,N., Roosen,J., Winderickx,J., de Virgilio,C. (2004) The novel yeast PAS kinase Rim15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms. *Cell Cycle* **3**: 462–468.
- Carlson,M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**: 202–207.
- Carotti,C., Ragni,E., Palomares,O., Fontaine,T., Tedeschi,G., Rodriguez,R., Latgé,J.P., Vai, M., Popolo,L. (2004) Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanotransferase activity and folding. *Eur J Biochem.* **271**: 3635-3645.
- Carter,G.W., Rupp,S., Fink,G.R., Galitski, T. (2006) Disentangling information flow in the Ras-cAMP signaling network. *Genome Res.* **16**: 520-526.
- Casado,C., Gonzalez,A., Platara,M., Ruiz, A., Ariño,J. (2011) The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast. *Biochem. J.* **438**: 523–533.
- Casamayor,A., Torrance,P.D., Kobayashi,T., Thorner,J., Alessi,D.R. (1999) Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol.* **9**: 186–197.
- Chen,R.E., Thorner,J. (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1311-1340.
- Chu,Y., Corey,D.R. (2012) RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Ther.* **22**: 271–274.
- Chuang,J.S., Schekman,R.W. (1996) Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol.* **135**: 597-610.
- Cid,V.J., Duran,A., del,R.F., Snyder,M.P., Nombela,C., Sanchez,M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**: 345-386.

- Claret,S., Gatti,X., Doignon,F., Thoraval,D., Crouzet,M. (2005) The Rgd1p Rho GTPase activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. **4**: 1375-1386.
- Collister,M., Didmon,M.P., MacIsaac,F., Stark,M.J., MacDonald,N.Q., Keyse,S.M. (2002) *YIL113w* encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slr2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* **527**: 186-192.
- Colombo,S., Ma,P., Cauwenberg,L. et al. (1998) Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. **17**: 3326–3341.
- Colombo,S., Ronchetti,D., Thevelein,J.M., Winderickx,J., Martegani,E. (2004) Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **279**: 46715-46722.
- Conrad,M., Schothorst,J., Kankipati,H.N., Van Zeebroeck,G., Rubio-Teixeira,M., Thevelein,J.M. (2014) Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. **38**: 254-299.
- Cullen,P.J., Schultz,J., Horecka,J., Stevenson,B.J., Jigami,Y., Sprague,G.F.Jr. (2000) Defects in protein glycosylation cause Sho1-dependent activation of a Ste12 signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**: 1005-1018.
- Cyert,M.S. (2003) Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun*. **311**: 1143-1150.
- Cyert,M.S., Philpott,C.C. (2013) Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**: 677–713.
- Dastidar,R.G., Hooda,J., Shah,A., Cao,T.M., Henke,R.M., Zhang,L. (2012) The nuclear localization of SWI/SNF proteins is subjected to oxygen regulation. *Cell Biosci* **2**:30.
- Davenport,K.R., Sohaskey,M., Kamada,Y., Levin,D.E., Gustin,M.C. (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinaseregulated cell integrity pathway. *J Biol Chem*. **270**: 30157-30161.
- de Nadal,E., Casadome,L., Posas,F. (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*. **23**: 229-237.
- de Nobel,H., Ruiz,C., Martín,H., Morris,W., Brul,S., Molina,M., Klis,F.M. (2000) Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slr2/Mpk1 MAP kinase and in an Slr2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146**: 2121-2132.
- de Nobel,J.G., Klis,F.M., Priem,J., Munnik,T., van Den,E.H. (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 491-499.
- de Virgilio,C. (2012) The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiol Rev*. **36**: 306–339.
- de Virgilio, C., Loewith,L. (2006) Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* **25**: 6392–6415.
- de Wever,V., Reiter,W., Ballarini,A., Ammerer,G., Brocard,C. (2005) A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *EMBO J*. **24**: 4115-4123.
- Dechant,R. Binda,M., Lee,S.S., Pelet,S., Winderickx,J., Peter,M. (2010) Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *The EMBO Journal* **29**: 2515–2526.

- Dechant,R., Peter,M. (2014) Cytosolic pH: A conserved regulator of cell growth? *Mol Cell Oncol.* **31**:1
- Dechant,R., Saad,S., Ibáñez,A.J., Peter,M. (2014) Cytosolic pH regulates cell growth through distinct GTPases, Arf1 and Gtr1, to promote Ras/PKA and TORC1 activity. *Mol Cell.* **55**: 409-421.
- Dechant,R., Peter,M. (2011) The N-terminal domain of the V-ATPase subunit 'a' is regulated by pH in vitro and in vivo. *Channels (Austin)* **5**:4-8.
- Delley,P.A., Hall,M.N. (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol.* **147**: 163-174.
- Deminoff,S.J., Howard,S.C., Hester,A., Warner,S., Herman,P.K. (2006) Using substrate-binding variants of the cAMP-dependent protein kinase to identify novel targets and a kinase domain important for substrate interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **173**: 1909–1917.
- Denning,W.D. (2002) Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**: 1142-1151.
- Dijkgraaf,G.J., Abe,M., Ohya,Y., Bussey,H. (2002) Mutations in Fks1p affect the cell wall content of beta-1,3- and beta-1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 671-690.
- Dodou,E., Treisman,R. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol.* **17**: 1848-1859.
- Dong,J., Bai,X. (2011) The membrane localization of Ras2p and the association between Cdc25p and Ras2-GTP are regulated by protein kinase A (PKA) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **585**: 1127–1134.
- Donlin,M.J., Upadhyay,R., Gerik,K.J., Lam,W., VanArendonk,L.G.,Specht,C.A., Sharma,N.K., Lodge,J.K. (2014) Cross talk between the cell wall integrity and cyclic AMP/protein kinase A pathways in *Cryptococcus neoformans*. *MBio.* **12**. pii: e01573-14
- Dupres,V., Alsteens,D., Wilk,S., Hansen,B., Heinisch,J.J., and Dufrene,Y.F. (2009) The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring *in vivo*. *Nat Chem Biol* **5**: 857-862.
- Durchschlag,E., Reiter,W., Ammerer,G., Schüller,C. (2004) Nuclear localization destabilizes the stress-regulated transcription factor Msn2. *J Biol Chem.* **279**: 55425-55432.
- Ecker,M, Deutzmann,R., Lehle,L., Mersa,V, Tanner,W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem.* **281**:11523-11529.
- Errede,B., Cade,R.M., Yashar,B.M., Kamada,Y., Levin,D.E., Irie,K., Matsumoto,K. (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev.* **42**:477-485.
- Fera,M.T., La Camera,E., De Sarro,A. (2009) New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **7**:981–998.
- Ferguson,M.A.J., Kinoshita,T., Hart,G.W. (2009) Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter **11**
- Fisher,M., Hawkins,N., Sanglard,D., Gurr,S. (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **360**: 739-742.
- Fox,G.C., Shafiq,M., Briggs,D.C., Knowles,P.P., Collister,M., Didmon,M.J., Makrantonis,V., Dickinson,R.J., Hanrahan,S., Totty,N., Stark,M.J., Keyse,S.M., McDonald,N.Q. (2007) Redox-mediated substrate recognition by Sdp1 defines a new group of tyrosine phosphatases. *Nature* **447**:487-492

- Friant,S., Lombardi,R., Schmelzle,T., Hall,M.N., Riezman,H. (2001) Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J.* **20**: 6783–6792.
- Fuller, K.K., Rhodes,J.C. (2012) Protein kinase A and fungal virulence: a sinister side to a conserved nutrient sensing pathway. *Virulence* **3**: 109–121.
- García,R., Bermejo,C., Grau,C., Perez,R., Rodríguez-Peña,J.M., François,J., Nombela,C., Arroyo, J. (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**: 15183-15195.
- Garcia,R., Botet,J., Rodríguez-Peña,J.M., Bermejo,C., Ribas,J.C., Revuelta,J.L., Nombela C., Arroyo,J. (2015) Genomic profiling of fungal cell wall-interfering compounds: identification of a common gene signature. *BMC Genomics* **16**: 683.
- Garcia,R., Rodriguez-Peña,J.M., Bermejo,C., Nombela,C., Arroyo,J. (2009) The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **284**: 10901-10911.
- Garcia,R., Sanz,A.B., Rodriguez-Peña,J.M., Nombela,C., Arroyo,J. (2016) Rlm1 mediates positive autoregulatory transcriptional feedback that is essential for Slt2-dependent gene expression. *J. Cell Sci.* **129**: 1649–1660.
- Garcia-Rodríguez,L.J., Valle,R., Duran,A., Roncero,C. (2005) Cell Integrity signaling activation in response to hiperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett* **579**: 6186-6190.
- Gardiner,F.C., Costa,R., Ayscough,K.R. (2007) Nucleocytoplasmic trafficking is required for functioning of the adaptor protein Sla1p in endocytosis. *Traffic* **8**:347-358.
- Gasch,A.P.,Spellman,P.T., Kao,C.M., CarmelHarel,O., Eisen,M.B., Storz,G., Botstein,D., Brow, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol.Biol.Cell* **11**: 4241-4257.
- Goffeau,A., Barrell,B.G., Bussey,H., Davis,R.W., Dujon,B., Feldmann,H. *et al* (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546-567.
- Goldman,R.C., Sullivan,P.A., Zakula,D., Capobianco,J.O. (1995) Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene. *Eur J Biochem.* **15**:372-378.
- Görner,W., Durchschlag,E., Martinez-Pastor,M.T., Estruch,F., Ammerer,G., Hamilton,B., Ruis, H., Schüller,C. (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* **12**: 586–597.
- Görner,W., Durchschlag,E., Wolf,J., Brown,E.L., Ammerer,G., Ruis,H., Schüller,C. (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J.* **21**:135-144.
- Gray,J.V., Ogas,J.P., Kamada,Y., Stone,M., Levin,D.E., Herskowitz,I. (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.* **16**: 4924-4937.
- Graef,M., Nunnari,J. (2011) Mitochondria regulate autophagy by conserved signalling pathways. *EMBO J.* **30**: 2101–2114.
- Green,R., Lesage,G., Sdicu,A.M., Ménard,P., Bussey,H. (2003) A synthetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* stress sensor Mid2p, and identification of aMid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Microbiology* **149**: 2487-2499.
- Griffioen,G., Branduardi,P., Ballarini,A., Anghileri,P., Norbeck,J. *et al.* (2001) Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is

regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 511–523.

Guo,M., Aston,C.,Burchett,S.A., Dyke,C., Fields,S., Rajarao,S.J., Uetz,P., Wang,Y., Young,K., Dohlman,H.G. (2003) The yeast G protein alpha subunit Gpa1 transmits a signal through an RNA binding effector protein Scp160. *Mol Cell.* **12**: 517-524.

Ha,C.W., Kim,K., Chang,Y.J., Kim,B., Huh,W.K. (2014) The β -1,3-glucanosyltransferase Gas1 regulates Sir2-mediated rDNA stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **42**: 8486-8499.

Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557-580.

Hao,N., O'Shea,E.K. (2001) Signal-dependent dynamics of transcription factor translocation controls gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**: 31–39.

Harashima,T., Heitman,J. (2002) The G alpha protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic G beta subunits. *Mol Cell* **10**: 163–173.

Hartland,R.P. *et al.* (1996) A novel β -(1-3)- glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **271**: 26843--26849.

Heinisch,J.J., Dupres,V., Alsteens,D., Dufrene,Y.F. (2010) Measurement of the mechanical behavior of yeast membrane sensors using single-molecule atomic force microscopy. *Nat Protoc* **5**: 670-677.

Helliwell,S.B., Wagner,P., Kunz,J., Deuter-Reinhard,M., Henriquez,R., Hall,M.N. (1994) TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* **5**: 105–118.

Hiesinger,M., Wagner,C., Schüller,H.J. (1997) The acetyl-CoA synthetase gene ACS2 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is coregulated with structural genes of fatty acid biosynthesis by the transcriptional activators Ino2p and Ino4p. *FEBS Lett.* **22**: 16-20.

Hohmann,S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**: 300-372

Hohmann,S. (2009) Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **583**: 4025-4029.

Hohmann,S., Meacock,P.A. (1998) Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim Biophys Acta* **1385**: 201–219.

Hu,Y., Liu,E., Bai,X., Zhang,A. (2010) The localization and concentration of the PDE2-encoded high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by cAMP-dependent protein kinase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **10**: 177–187.

Hutzler,F., Gerstl,R., Lommel,M., Strahl,S. (2008) Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Mol Microbiol.* **68**:1438-1449.

Igual,J.C., Johnson,A.L., Johnston,L.H. (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* **15**: 5001-5013.

Inagaki,M., Schmelzle,T., Yamaguchi,K., Irie,K., Hall,M.N., Matsumoto,K. (1999) PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol.* **19**: 8344-8352.

- Inoue,S.B., Qadota,H., Arisawa,M., Watanabe,T., Ohya,Y. (1999) Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1, 3-beta-glucan synthase. *J Biol Chem.* **274**: 38119-38124.
- Irie,K., Takase,M., Lee,K.S., Levin,D.E., Araki,H., Matsumoto,K., Oshima,Y. (1993) Mkk1 and Mkk2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol.* **13**: 3076-3083.
- Ito,H., Fukuda,Y., Murata,K., Kimura,A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Iwamoto,M.A., Fairclough,S.R., Rudge,S.A., Engebrecht,J. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Sps1p regulates trafficking of enzymes required for spore wall synthesis. *Eukaryot Cell.* **4**: 536-544.
- Iwamoto,T., Fujie,A., Nitta,K., Hashimoto,S., Okuhara,M., Kohsaka,M. (1994) WF11899A, B and C, novel antifungal lipopeptides, I: taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J Antibiot* **47**: 1084-1091.
- Iyer,V.R., Horak,C.E., Scafe,C.S., Botstein,D., Snyder,M., Brown,P.O. (2001) Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* **409**: 533-538.
- Jacinto,E., Lorberg,A. (2008) TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J.* **410**: 19-37.
- Jacoby,J.J., Nilius,S.M., Heinisch,J.J. (1998) A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the *SLG1* gene. *Mol Gen Genet.* **258**: 148-155.
- Jang,Y.K., Wang,L., Sancar,G.B. (1999) *RPH1* and *GIS1* are damage-responsive repressors of *Phr1*. *Mol Cell Biol.* **19**: 7630–7638.
- Jiménez-Sánchez,M., Cid,V.J., Molina,M. (2007) Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slf2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem.* **282**: 31174-31185.
- Jorgensen,P., Rupes,I., Sharom,J.R., Schnepfer,L., Broach,J.R., Tyers,M. (2004) A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev.* **18**: 2491–2505.
- Jung,U.S., Levin,D.E. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**: 1049-1057.
- Jung,U.S., Sobering,A.K., Romeo,M.J., Levin,D.E. (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol.* **46**: 781-789.
- Kapteyn,J.C., Ram,A.F., Groos,E.M., Kollar,R., Montijn,R.C., van den,E.H. *et al.* (1997) Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol.* **179**: 6279-6284
- Kapteyn,J.C., ter Riet,B., Vink,E., Blad,S., De Nobel,H., van Den Ende,H., Klis,F.M. (2001) Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol.* **39**:469-479.
- Kataoka,T., Broek,D., Wigler,M. (1985) DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell* **43**: 493–505.
- Ketela,T., Green,R., Bussey,H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol.* **181**: 3330-3340.
- Kim,K.-Y., Levin,D.E. (2010) Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast* **27**: 541–548.

- Kim,K.-Y., Levin,D.E. (2011) Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination. *Cell* **144**: 745–756.
- Kim,K.Y., Truman,A.W., Caesar,S., Schlenstedt,G., Levin,D.E. (2010) Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol Biol Cell*. **21**: 1609-1619
- Kim,K.Y., Truman,A.W., Levin,D.E. (2008) Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol*. **28**: 2579-2589.
- Klis,F.M., Mol,P., Hellingwerf,K., Brul,S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. **26**: 239-256.
- Kollar,R., Petrakova,E., Ashwell,G., Robbins,P.W., Cabib,E. (1995) Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan. *J Biol Chem* **270**: 1170-1178.
- Kollar,R., Reinhold,B.B., Petrakova,E., Yeh,H.J., Ashwell,G., Drgonova,J. Kapteyn,J.C., Klis,F.M., Cabib,E. (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**: 17762-17775.
- Kraakman,L., Lemaire,K., Ma,P. Teunissen,A.W., Donaton ,M.C., Van Dijck,P., Winderickx,J., de Winde,J.H., Thevelein,J.M. (1999) A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol*. **32**: 1002–1012.
- Kullberg,B.J., Sobel,J.D., Ruhnke,M. et al. (2005) Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* **366**: 1435–1442.
- Kuranda,M.J., Robbins,P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **266**: 19758-19767
- Kurtz,M.B., Rex,J. H. (2001) Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. *Adv Protein Chem*. **56**: 423-475.
- Lagorce,A., Hauser,N.C., Labourdette,D., Rodríguez,C., Martín-Yken,H., Arroyo,J. Hoheisel,J.D., François,J. (2003) Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **278**: 20345-20357.
- Lagorce,A., Le Berre-Anton,V., Aguilar-Uscanga,B., Martin-Yken,H., Dagkessamanskaia,A., François,J. (2002) Involvement of *GFA1*, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. **269**: 1697-1707.
- Lallet,S., Garreau,H., Garmendia-Torres,C., Szeszakowska,D., Boy-Marcotte,E., Quevillon-Chérueil,S., Jacquet,M. (2006) Role of Gal11, a component of the RNA polymerase II mediator in stress-induced hyperphosphorylation of Msn2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. **62**: 438-452.
- Lee,K.S., Levin,D.E. (1992) Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (Bck1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol*. **12**: 172-182.
- Lee,P., Cho,B.R., Joo,H.O., Hahn,J.S. (2008) Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol. Microbiol*. **70**: 882– 895.
- Lee,P., Kim,M.S., Paik,S.M., Choi,S.H., Cho,B.R., Hahn,J.S. (2013) Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. **587**: 648-655.

- Lemaire,K., van de Velde,S., van Dijck,P., Thevelein,J.M. (2004) Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **16**: 293–299.
- Lempiainen,H., Shore,D. (2009) Growth control and ribosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* **21**: 855–863
- Lesage,G., Bussey,H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**: 317-343.
- Lesage,G., Sdicu,A.M., Ménard,P., Shapiro,J., Hussein,S., Bussey,H. (2004) Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics* **167**:35-49.
- Lesage,G., Shapiro,J., Specht,C.A., Sdicu,A.M., Ménard,P., Hussein,S., Tong,A.H., Boone,C., Bussey,H. (2005) An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet.* **16**: 6-8.
- Levin,D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262-291.
- Levin,D.E.(2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**: 1145-1175
- Levin,D.E., Bowers,B., Chen,C.Y., Kamada,Y., Watanabe,M. (1994) Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae* . *Cell Mol Biol Res.* **40**: 229-239.
- Lipke,P.N., and Kurjan,J. (1992) Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev.* **56**: 180-194.
- Livak,K.J., Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lodder,A.L., Lee,T.K., Ballester,R. (1999) Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**: 1487-1499.
- Loewith,R., Hall,M.N. (2011) Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **189**: 1177– 1201.
- Loewith,R., Jacinto,E., Wullschleger,S., Lorberg,A., Crespo,J.L., Bonenfant,D., Oppliger,W., Jenoe,P., Hall,M.N. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* **10**: 457-68.
- Lu,A., Hirsch, J.P. (2005) Cyclic AMP-independent regulation of protein kinase A substrate phosphorylation by Kelch repeat proteins. *Eukaryot. Cell* **4**: 1794–1800.
- Ly,N., Cyert,M.S. (2017) Calcineurin, the Ca²⁺-dependent phosphatase, regulates Rga2, a Cdc42 GTPase-activating protein, to modulate pheromone signaling. *Mol Biol Cell.* **28**: 576-586.
- Ma,P., Wera,S., van Dijck,P., Thevelein,J.M. (1999) The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol Biol Cell* **10**: 91-104.
- Madhani,H.D., Fink,G.R. (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314-1317.
- Magasanik,B., Kaiser,C.A. (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **290**: 1–18.
- Malcher,M., Schladebeck,S. Mosch,H.U. (2011) The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **187**: 717–730.

- Marchler,G., Schüller,C., Adam,G., Ruis,H. (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**: 1997-2003.
- Marcoux,N., Bourbonnais,Y., Charest,P.M., Pallotta,D. (1998) Overexpression of MID2 suppresses the profilin-deficient phenotype of yeast cells. *Mol Microbiol.* **29**: 515-526.
- Maresova,L., Hoskova,B., Urbankova,E., Chaloupka,R., Sychrova,H. (2010) New applications of pHluorin—measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* **27**: 317–325.
- Markovich,S., Yekutieli,A., Shalit,I., Shadkchan,Y., Osherov,N. (2004). Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3871–3876.
- Martin,D.E., Soulard,A., Hall,M.N. (2004) TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor Fhl1. *Cell* **119**: 969–979.
- Martín,H., Rodríguez-Pachon,J.M., Ruiz,C., Nombela,C., Molina,M. (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **275**: 1511-1519.
- Martinez-Pastor,M.T., Marchler,G., Schuller,C., Marchler-Bauer,A., Ruis,H., Estruch,F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**: 2227–2235.
- Masurekar,P.S., Fountoulakis,J.M., Hallada,T.C., Sosa,M.S., Kaplan,L. (1992) Pneumocandins from *Zalerion arboricola*, II: modification of product spectrum by mutation and medium manipulation. *J Antibiot* **45**: 1867-1874.
- Mattison,C.P., Spencer,S.S., Kresge,K.A., Lee,J., Ota,I.M. (1999) Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol Cell Biol.* **19**: 7651-7660.
- Mayordomo,I., Estruch,F., Sanz,P. (2002) Convergence of the target of rapamycin and the Snf1 protein kinase pathways in the regulation of the subcellular localization of Msn2, a transcriptional activator of STRE (Stress Response Element)-regulated genes. *J Biol Chem.* **277**: 35650-35856.
- Mazán,M., Blanco,N., Kováčová,K., Firakova,Z., Rehulka,P., Farkas,V., Arroyo,J. (2013) A novel fluorescence assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochem J.* **455**: 307–318.
- Mazur,P., Baginsky,W. (1996) In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTPbinding protein Rho1. *J Biol Chem.* **271**: 14604-14609.
- Medvedik,O., Lamming,D.W., Kim,K.D., Sinclair,D.A. (2007) Msn2 and Msn4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol.* **5**:e261.
- Merlini,L., Piatti,S. (2011) The mother-bud neck as a signaling platform for the coordination between spindle position and cytokinesis in budding yeast. *Biol. Chem.* **392**: 805–812.
- Momcilovic,M., Iram,S.H., Liu,Y., Carlson,M. (2008) Roles of the glycogen-binding domain and Snf4 in glucose inhibition of Snf1 protein kinase. *J Biol Chem.* **283**: 19521–19529.
- Monteiro,P.T., Mendes,N.D., Teixeira,M.C., d'Orey,S., Tenreiro,S., Mira,N.P., Pais,H., Francisco,A.P., Carvalho,A.M., Lourenço,A.B., Sá-Correia,I., Oliveira,A.L., Freitas,A.T. (2008) YEASTRACT-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **36**: D132-136.
- Mora-Duarte,J., Betts,R., Rotstein,C. et al. (2002) Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* **347**: 2020–2029.

- Moriya,H., Shimizu-Yoshida,Y., Omori,A., Iwashita,S., Katoh,M. et al. (2001) Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes Dev.* **15**: 1217–1228.
- Mourad,A., Perfect,J.R. (2018) Tolerability profile of the current antifungal armoury. *J Antimicrob Chemother.* **73**: 26-32.
- Mouyna,I., Fontaine,T., Vai,M., Monod,M., Fonzi,W.A., Diaquin,M. et al. (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanotransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* **275**: 14882-14889.
- Nakafuku,M., Obara,T., Kaibuchi,K. et al. (1988) Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (*GPA2*) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *P Natl Acad Sci USA.* **85**: 1374–1378.
- Neiman,A.M. (2005) Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **69**: 565-584.
- Nikawa,J., Sass,P., Wigler,M. (1987) Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **7**:3629-3636.
- Nonaka,H., Tanaka,K., Hirano,H., Fujiwara,T., Kohno,H., Umikawa,M. et al. (1995) A downstream target of Rho1 small GTP-binding protein is Pkc1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* . *EMBO J.* **14**: 5931-5938.
- Nordberg,N., Olsson,I., Carlsson,M., Hu,G.Z., Orzechowski-Westholm,J., Ronne,H. (2014) The histone demethylase activity of Rph1 is not essential for its role in the transcriptional response to nutrient signaling. *PLoS One.* **9**: e95078.
- Onishi,J., Meinz,M., Thompson,J., Curotto,J., Dreikorn,S., Rosenbach,M., Douglas,C., et al (2000) Discovery of Novel Antifungal (1,3)- β -d-Glucan Synthase Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 368–377.
- Ono,T., Suzuki,T., Anraku,Y., Iida,H. (1994) The *MID2* gene encodes a putative integral membrane protein with a Ca(2+)-binding domain and shows mating pheromone-stimulated expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **151**: 203-208.
- Orlean,P. (2012) Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**: 775-818.
- Orlova,M., Kanter,E., Krakovich,D., Kuchin,S. (2006) Nitrogen availability and TOR regulate the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **5**: 1831–1837.
- Orzechowski-Westholm,J., Tronnorsjö,S., Nordberg,N., Olsson,I., Komorowski,J., Ronne,H. (2012) Gis1 and Rph1 regulate glycerol and acetate metabolism in glucose depleted yeast cells. *PLoS One* **7**: e31577.
- Ozaki,K., Tanaka,K., Imamura,H., Hihara,T., Kameyama,T., Nonaka,H. et al. (1996) Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**: 2196-2207.
- Palacios,L., Dickinson,R.J., Sacristán-Reviriego,A., Didmon,M.P., Marín,M.J., Martín,H., Keyse, S.M., Molina,M. (2011) Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity MAPKs in *S. cerevisiae*. *J Biol Chem.* **286**:42037-42050
- Papasavvas,S., Arkinstall,S., Reid,J., Payton,M. (1992) Yeast alpha-mating factor receptor and G-protein-linked adenylyl cyclase inhibition requires Ras2 and Gpa2 activities. *Biochem Biophys Res Commun.* **184**: 1378–1385.
- Park,J.I., Collinson,E.J., Grant,C M., Dawes,I.W. (2005) Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway. *J. Biol. Chem.* **280**: 2529–2535.

- Pedruzzi,I, Dubouloz,F., Cameroni,E., Wanke,V., Roosen,J., Winderickx,J., de Virgilio,C. (2003) TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol Cell*. **12**: 1607–1613.
- Pedruzzi,I., Burckert,N., Egger,P., de Virgilio,C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *EMBO J*. **19**: 2569–2579.
- Peeters,T., Louwet,W., Gelade,R., Nauwelaers,D., Thevelein,J.M., Versele,M. (2006) Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**: 13034–13039.
- Pérez,P., Rincón,S.A. (2010) Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J*. **426**: 243-253.
- Petkova,M.I., Pujol-Carrion,N., Arroyo,J., García-Cantalejo,J., Angeles de la Torre-Ruiz,M. (2010) Mtl1 is required to activate general stress response through Tor1 and Ras2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. *J Biol Chem*. **285**: 19521-19531.
- Piao,H.L., Machado,I.M., Payne,G.S. (2007) NPFXD-mediated endocytosis is required for polarity and function of a yeast cell wall stress sensor. *Mol Biol Cell*. **18**: 57-65
- Pincus,D., Aranda-Diaz,A., Zuleta,I.A. (2014) Delayed Ras/PKA signaling augments the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci*. **111**: 14800–14805.
- Popolo,L., Gualtieri,T., Ragni,E. (2001) The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* **1**: 111-121.
- Portela,P., Howell,S., Moreno,S., Rossi,S. (2002) In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J Biol Chem*. **277**: 30477–30487.
- Powers,S., Kataoka,T., Fasano,O., Goldfarb,M., Strathern,J., Broach,J., Wigler,M. (1984) Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins. *Cell* **36**: 607–612.
- Primig,M., Sockanathan,S., Auer,H., Nasmyth,K. (1992) Anatomy of a transcription factor important for the start of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **358**: 593-597.
- Qadota,H., Python,C.P., Inoue,S.B., Arisawa,M., Anraku,Y., Zheng,Y. et al. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**: 279-281.
- Qi,M., Elion,E.A. (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci*. **118**: 3569-3572.
- Quan,Z., Oliver,S.G., Zhang,N. (2011) JmjN interacts with JmjC to ensure selective proteolysis of Gis1 by the proteasome. *Microbiology* **157**: 2694-2701.
- Rajavel,M., Philip,B., Buehrer,B.M., Errede,B., Levin,D.E. (1999) Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 3969-3976.
- Ramachandran,V., Shah K.H., Herman,P.K. (2011) The cAMP-dependent protein kinase signaling pathway is a key regulator of P body foci formation. *Mol Cell*. **43**: 973–981.
- Reinders,A., Burckert,N., Boller,T., Wiemken,A., de Virgilio,C. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev*. **12**: 2943–2955.
- Reinke,A., Anderson,S., McCaffery,J.M. et al. (2004) TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **279**: 14752–14762.

- Reinoso-Martín,C., Schuller,C., Schuetzer-Muehlbauer,M., Kuchler,K. (2003) The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* **2**: 1200-1210.
- Reiter,W., Klopff,E., de Wever,V., Anrather,D., Petryshyn,A., Roetzer,A., Niederacher,G., Roitie,E., Dohnal,I., Görner,W., Mechtler,K., Brocard,C., Schüller,C., Ammerer,G. (2013) Yeast protein phosphatase 2A-Cdc55 regulates the transcriptional response to hyperosmolarity stress by regulating Msn2 and Msn4 chromatin recruitment. *Mol Cell Biol.* **33**: 1057-1072.
- Rep,M., Proft,M., Remize,F., Tamás,M., Serrano,R., Thevelein,J.M., Hohmann,S. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol.* **40**:1067-1083.
- Rep,M., Reiser,V., Gartner,U., Thevelein,J.M., Hohmann,S., Ammerer,G., Ruis,H. (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol.* **19**: 5474-5485.
- Reyes,A., Sanz,M., Duran,A., Roncero,C. (2007) Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **120**: 1998–2009.
- Rittenhouse,J., Moberly,L., Marcus,F. (1987) Phosphorylation *in vivo* of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase at the cyclic AMP-dependent site. *J Biol Chem.* **262**: 10114–10119.
- Robertson,L.S., Fink,G.R. (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13783–13787.
- Rodríguez-Peña,J.M., Cid,V.J., Arroyo,J., Nombela,C. (2000) A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol.* **20**: 3245-3255.
- Rodríguez-Peña,J.M., Díez-Muñoz,S., Bermejo,C., Nombela,C., Arroyo,J. (2013) Activation of the yeast cell wall integrity MAPK pathway by zymolyase depends on protease and glucanase activities and requires the mucin-like protein Hkr1 but not Msb2. *FEBS Lett.* **587**: 3675-3680.
- Rodriguez-Peña,J.M., Rodriguez,C., Alvarez,A., Nombela,C., Arroyo,J. (2002) Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarised growth sites. *J Cell Sci.* **115**: 2549-2558.
- Roh,D.H., Bowers,B., Riezman,H., Cabib,E. (2002) Rho1p mutations specific for regulation of beta(1-->3)glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. *Mol Microbiol.* **44**: 1167-1183.
- Rolland,F., de Winde,J.H., Lemaire,K., Boles,E., Thevelein,J.M., Winderickx,J. (2000) Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol.* **38**: 348–358.
- Roncero,C. (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* **41**: 367–378.
- Roncero,C., Durán,A. (1985) Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: *in vivo* activation of chitin polymerization. *J Bacteriol.* **163**:1180-1185.
- Roosen,J., Engelen,K., Marchal,K. et al. (2005) PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol Microbiol* **55**: 862– 880.
- Roumanie,O., Weinachter,C., Larrieu,I., Crouzet,M., Doignon,F. (2001) Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **506**: 149–156.
- Roy,J., Li,H., Hogan,P.G., Cyert,M.S. (2007) A conserved docking site modulates substrate affinity for calcineurin, signaling output, and *in vivo* function. *Mol Cell.* **25**: 889-901.

- Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santangelo,G.M. (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**: 253–282.
- Sanz,A.B., García,R., Rodríguez-Peña,J.M., Arroyo,J. (2018) The CWI Pathway: Regulation of the Transcriptional Adaptive Response to Cell Wall Stress in Yeast. *Journal of Fungi* **4**: 1.
- Sanz,A.B. García,R., Rodríguez-Peña,J.M., Díez-Muñoz,S., Nombela,C., Peterson,C.L., Arroyo,J. (2012) Chromatin remodeling by the SWI/SNF complex is essential for transcription mediated by the yeast cell wall integrity MAPK pathway. *Mol. Biol. Cell* **23**: 2805–2817.
- Sanz,A.B., García,R., Rodríguez-Peña,J.M., Nombela, C., Arroyo, J. (2016) Cooperation between SAGA and SWI/SNF complexes is required for efficient transcriptional responses regulated by the yeast MAPK Slt2. *Nucleic Acids Res.* **44**: 7159–7172.
- Sarkar,S., Dalgaard,J.Z., Millar,J.B., Arumugam,P. (2013) The Rim15-endosulfine-PP2A Cdc55 signalling module regulates entry into gametogenesis and quiescence via distinct mechanisms in budding yeast. *Cell Rep.* **3**: 16-22.
- Schepers,W., van Zeebroeck,G., Pinkse,M., Verhaert,P., Thevelein,J.M. (2012) In vivo phosphorylation of Ser21 and Ser83 during nutrient-induced activation of the yeast protein kinase A (PKA) target trehalase. *J Biol Chem.* **287**: 44130–44142.
- Schmelzle,T., Beck,T., Martin,D.E., Hall,M.N. (2003) Activation of the RAS/Cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 338–351.
- Schmelzle,T., Hall,M.N. (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**: 253–262.
- Schmelzle,T., Helliwell,S.B., Hall,MN. (2002) Yeast protein kinases and the Rho1 exchange factor Tu1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol Cell Biol.* **22**: 1329-1339.
- Schmidt,A., Schmelzle,T., Hall,M.N. (2002b) The RHO1-GAPs Sac7, Bem2 and Bag7 control distinct Rho1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **45**: 1433-1441.
- Schmitt,A.P., McEntee,K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 5777-5782.
- Schuller,H.J. (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* **43**: 139–160.
- Sekiya-Kawasaki,M., Abe,M., Saka,A., Watanabe,D., Kono,K., Minemura-Asakawa,M., Ishihara,S., Watanabe,T., Ohya,Y. (2002) Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**: 663-76.
- Serrano,R., Martín,H., Casamayor,A., Ariño,J. (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J Biol Chem.* **281**: 39785-39795.
- Shahinian,S., Bussey,H. (2000) β -1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **35**: 477–489.
- Smets, B., Ghillebert,R., de Snijder,P., Binda,M., Swinnen,E. et al. (2010) Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **56**: 1–32.
- Smits,G.J., van Den,E.H., Klis,F.M. (2001) Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794.

- Soulard,A., Cremonesi,A., Moes,S., Schütz,F., Jenö,P., Hall,M.N. (2010) The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell*. **21**: 3475-3486.
- Spellman,P.T., Sherlock,G., Zhang,M.Q., Iyer,V.R., Anders,K., Eisen,M.B., Brown,P.O. Botstein, D., Futcher,B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*. **9**: 3273-3297.
- Straede,A., Heinisch,J.J. (2007) Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS Lett* **18**: 4495-500.
- Strahl-Bolsinger,S., Gentzsch,M., Tanner,W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 297-307.
- Sundaram,V., Petkova,M.I., Pujol-Carrion,N., Boada,J., de la Torre-Ruiz,M.A. (2015) Tor1, Sch9 and PKA downregulation in quiescence rely on Mtl1 to preserve mitochondrial integrity and cell survival. *Mol Microbiol*. **97**: 93-109.
- Sunnåker,M., Zamora-Sillero,E., Dechant,R., Ludwig,C., Busetto,A.G., Wagner,A., Stelling,J. (2013) Automatic generation of predictive dynamic models reveals nuclear phosphorylation as the key Msn2 control mechanism. *Sci Signal*. **28**: ra41.
- Svoboda,A. (1981) Polyethylene glycol induced membrane fusion in yeast protoplasts. *Acta Histochem Suppl* **23**: 211-217.
- Swinnen,E., Ghillebert,R., Wilms,T., Winderickx,J. (2014) Molecular mechanisms linking the evolutionary conserved TORC1-Sch9 nutrient signalling branch to lifespan regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. **14**: 17–32.
- Swinnen,E., Wanke,V., Roosen,J., Smets,B., Dubouloz,F., Pedruzzi,I., Cameroni,E., de Virgilio,C.,Winderickx,J. (2006) Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Div*. **1**:3.
- Taba,M.R., Muroff,I., Lydall,D., Tebb,G., Nasmyth,K. (1991) Changes in a SWI4,6-DNA-binding complex occur at the time of HO gene activation in yeast. *Genes Dev*. **5**: 2000-2013.
- Tamanoi,F. (2011) Ras signaling in yeast. *Genes Cancer* **2**: 210– 215.
- Tanaka,K., Nakafuku,M., Satoh,T. et al. (1990) *S. cerevisiae* genes *IRA1* and *IRA2* encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian ras GTPase activating protein. *Cell* **60**: 803–807.
- Teparic,R., Stuparevic,I., Mrsa,V. (2004) Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology* **150**: 3145-3150.
- Thevelein,J.M., de Winde,J.H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. **33**: 904–918.
- Toda,T., Broek,D., Field,J., Michaeli,T., Cameron,S., Nikawa,J., Sass,P., Birchmeier,C., Powers, S., Wigler,M, (1986) .Exploring the function of RAS oncogenes by studying the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Princess Takamatsu Symp*. **17**: 253-260.
- Toda,T., Cameron,S., Sass,P. et al. (1987b) Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **7**: 1371–1377.
- Toda,T., Sass,P. (1988)The cAMP-dependent protein kinase genes in yeast. *Oxf Surv Eukaryot Genes*. **5**: 133-161.
- Torres,L., Martín,H., García-Saez,M.I., Arroyo,J., Molina,M., Sánchez,M., Nombela,C. (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol*. **5**: 2845-2854.

- Truman,A.W., Kim,K.-Y., Levin,D.E. (2009) Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **29**: 6449–6461.
- Urban,J., Souillard,A., Huber,A. et al. (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **26**: 663–674.
- Valdivia,R.H., Schekman,R. (2003) The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10287–10292.
- Valdivieso,M.H., Mol,P.C., Shaw,J.A., Cabib,E., Duran,A. (1991) *CAL1*, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **114**: 101–109.
- Van Drogen,F., Peter,M. (2002) Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol.* **12**: 1698–1703.
- Vandamme,J., Castermans,D., Thevelein,J.M. (2012) Molecular mechanisms of feedback inhibition of protein kinase A on intracellular cAMP accumulation. *Cell Signal.* **24**: 1610–1618.
- Vay,H.A., Philip,B., Levin,D.E. (2004) Mutational analysis of the cytoplasmic domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. *Microbiology* **150**: 3281–3288.
- Vazquez,M., Nogales-Cadenas,R., Arroyo,J., Botías,P., García,R., Carazo,J.M., Tirado,F., Pascual-Montano,A., Carmona-Saez,P. (2010) MARQ: an online tool to mine GEO for experiments with similar or opposite gene expression signatures. *Nucleic Acids Res*: W228–232.
- Verna,J., Lodder,A., Lee,K., Vagts,A., Ballester,R. (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13804–13809.
- Versele,M., Thorner,J. (2004) Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J Cell Biol.* **164**: 701–715.
- Verstrepen,K.J., Derdelinckx,G., Verachtert,H., Delvaux,F.R. (2003) Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol.* **61**: 197–205.
- Vidan,S., Mitchell,A.P. (1997) Stimulation of yeast meiotic gene expression by the glucose-repressible protein kinase Rim15p. *Mol Cell Biol.* **17**: 2688–2697.
- Vilella,F., Herrero,E., Torres,J., de la Torre-Ruiz MA (2005) Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem.* **280**: 9149–9159.
- Voordeckers,K., Kimpe,M., Haesendonckx ,S., Louwet,W., Versele,M., Thevelein,J.M. (2011) Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (Pdk1) orthologs Pkh1-3 differentially regulate phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the protein kinase B (PKB)/ S6K ortholog Sch9. *J Biol Chem.* **286**: 22017–22027.
- Wach,A., Brachat,A., Alberti-Segui,C., Rebischung,C., Philippsen, P. Heterologous (1997) *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1065–1075.
- Wang,G., Deschenes,R.J. (2006) Plasma membrane localization of Ras requires class C Vps proteins and functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **26**: 3243–3255.
- Wang,J.L., Chang,C.H., Young-Xu,Y. et al. (2010) Systematic review and metaanalysis of the tolerability and hepatotoxicity of antifungals in empirical and definitive therapy for invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 2409–2419.

- Wang,J.F., Xue,Y., Zhu,X.B. et al. (2015) Efficacy and safety of echinocandins versus triazoles for the prophylaxis and treatment of fungal infections: a metaanalysis of RCTs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **34**: 651–659.
- Wanke,V., Cameroni,E., Uotila,A., Piccolis,M., Urban,J., Loewith,R., de Virgilio,C. (2008) Caffeine extends yeast lifespan by targeting *TORC1*. *Mol Microbiol* **69**: 277–285.
- Wanke,V., Pedruzzi,I., Cameroni,E., Dubouloz,F., de Virgilio,C. (2005) Regulation of G(0) entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *Embo J*. **24**: 4271–4278.
- Watanabe,D., Abe,M., Ohya,Y. (2001) Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3-beta-glucan synthesis. *Yeast* **18**: 943-951.
- Watanabe,Y., Irie,K., Matsumoto,K. (1995) Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*. **15**: 5740-5749.
- Wedaman,K.P., Reinke,A., Anderson,S., Yates,J.III, McCaffery,J.M., Powers,T. (2003) Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**: 1204–1220.
- Wittenberg,C., Reed,S.I. (2005) Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors and transcriptomes. *Oncogene* **24**: 2746-2755.
- Wullschleger,S., Loewith,R., Oppliger,W., Hall,M.N. (2005) Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem*. **280**: 30697–30704.
- Xie,J.L., Polvi,E.J., Shekhar-Guturja,T., Cowen,L.E. (2014) Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future Microbiol* **9**: 523–542.
- Xue,Y., Batlle,M., Hirsch,J.P. (1998) *GPR1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J*. **17**: 1996–2007.
- Yin,Q.Y., de Groot,P.W., de Jong,L., Klis,F.M., de Koster,C.G. (2007) Mass spectrometric quantitation of covalently bound cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. **7**: 887–896.
- Yoshimoto,H., Saltzman,K., Gasch,A.P., Li,H.X., Ogawa,N., Botstein,D., Brown,P.O., Cyert,M.S. (2002) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **277**: 31079-31088.
- Zaman,S., Lippman,S.I., Schneper,L., Slonim,N., Broach,J.R. (2009) Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Mol Syst Biol*. **5**: 245.
- Zhang,J., Varga,S., Chumnantpue, P., Kumar,R., Vemuri,G.N., Aebersold,R., Nielsen,J. (2011) Mapping the interaction of Snf1 with *TORC1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Syst Biol* **7**: 545.
- Zlotnik,H., Fernandez,M.P., Bowers,B., Cabib,E. (1984) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol*. **3**: 1018-1026.

ANEXOS

TABLA SUPLEMENTARIA 1. Clasificación funcional, descripción y comparación de los genes que se inducen en presencia de caspofungina. Los valores mostrados corresponden al valor medio de inducción al comparar los perfiles transcripcionales en presencia y ausencia de caspofungina (15 ng/ml) durante 2 horas en 6 experimentos independientes. Los grupos funcionales, así como la descripción de los ORFs, fueron asignados según la información obtenida en la base de datos informática SGD (*Saccharomyces Genome Database*). Los ORFs inducidos en presencia de caspofungina (ratio +/- droga ≥ 2) que también se inducen en presencia de Rojo Congo (RC) o zimoliasa (ZI) están señalados con un punto negro. Los genes inducidos en presencia de caspofungina en el presente trabajo y en el de Agarwall *et al* (2003) (1) están señalados también con un punto negro.

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	Descripción	RC	ZI	1
Respuesta a estrés						
YFL014W	HSP12	13,3	Proteína implicada en el mantenimiento de la estructura de la membrana	•	•	•
YMR175W	SIP18	10,5	Hidrofilina de unión a fosfolípidos			
YMR169C	ALD3	8,9	Aldehído deshidrogenasa citoplasmática		•	•
YOL052C-A	DDR2	7,0	Proteína de respuesta a estrés general	•		
YPL223C	GRE1	6,4	Hidrofilina esencial en el proceso de desecación – rehidratación			•
YGR088W	CTT1	5,4	Catalasa T citosólica		•	•
YDR453C	TSA2	4,5	Tioredoxina peroxidasa citoplasmática inducida por estrés			
YGR213C	RTA1	4,0	Proteína implicada en la resistencia al 7-aminocolesterol	•		•
YMR174C	PAI3	4,0	Inhibidor citoplasmático de proteinasa A (Pep4p)			
YIL101C	XBP1	3,2	Represor transcripcional que se une a los promotores de los genes de las ciclinas			
YBR072W	HSP26	3,2	Pequeña proteína de shock térmico (sHSP) con actividad caperona			
YMR095C	SNO1	3,0	Proteína implicada en el metabolismo de piridoxina			
YGR144W	THI4	2,9	Proteína implicada en la formación de tiazol			•
YPR005C	HAL1	2,5	Proteína citoplasmática involucrada en halotolerancia	•	•	
YDL110C	TMA17	2,4	Chaperona ATPasa que adapta el proteosoma al estrés			•
YMR096W	SNZ1	2,4	Proteína implicada en la biosíntesis de vitamina B6			
YDL243C	AAD4	2,3	Deshidrogenasa implicada en la respuesta a estrés oxidativo			
YDR074W	TPS2	2,3	Subunidad fosfatasa del complejo trehalosa-6-sintasa			
YCR104W	PAU3	2,3	Miembro de la familia multigenética seripauperina			
YMR040W	YET2	2,2	Proteína de función desconocida que interacciona con los ribosomas	•		•
YBR203W	COS111	2,2	Proteína requerida para la resistencia al antifúngico ciclopirox olamina	•		
YDR533C	HSP31	2,2	Metilglicoxalasa que convierte metilglicoxal en D-lactato			
YMR322C	SNO4	2,1	Posible chaperona y cisteína proteasa			
YML100W	TSL1	2,1	Subunidad grande del complejo trehalosa sintasa-6-fosfato		•	
YGR008C	STF2	2,1	Proteína implicada en la resistencia a la desecación			
YER037W	PHM8	2,0	Ácido lisofosfatídico fosfatasa			•
YDR001C	NTH1	2,0	Proteína implicada en la degradación de trehalosa	•		•
Transporte						
YHR096C	HXT5	38,2	Transportador de hexosa con una afinidad moderada por la glucosa	•		•
YNR002C	ATO2	7,5	Proteína putativa transmembrana implicada en la exportación de amonio			•
YDR536W	STL1	6,6	Transportador de glicerol de la membrana plasmática			
YNL093W	YPT53	4,9	GTPasa de la familia Rab inducida por estrés	•		
YCL069W	VBA3	4,5	Permeasa de aminoácidos básicos de la membrana vacuolar			
YOR348C	PUT4	3,8	Proteína implicada en el transporte de prolina por alta afinidad			
YGR243W	MPC3	3,8	Subunidad altamente conservada del transportador de piruvato mitocondrial			•
YIL023C	YKE4	3,0	Transportador de zinc, localizado en el RE	•		•
YPR194C	OPT2	2,9	Transportador de oligopéptidos			
YBR294W	SUL1	2,9	Sulfato permeasa de alta afinidad de la familia transportadora de aniones SulP			
YDR342C	HXT6	2,9	Transportador de glucosa de alta afinidad			
YNR065C	---	2,9	Proteína de función desconocida	•		•

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	Descripción	RC	ZI	1
YNL293W	MSB3	2,7	GTPasa de la familia Rab reguladora de la endocitosis	•		
YCR010C	ADY2	2,6	Transportador de acetato requerido para la esporulación			
YKL217W	JEN1	2,6	Simportador de monocarboxilato protón de la membrana plasmática			
YAL053W	FLC2	2,4	Canal putativo de calcio	•		
YGR121C	MEP1	2,4	Amonio permeasa			
YOR273C	TPO4	2,3	Transportador de olamina			
YKR039W	GAP1	2,3	Permeasa de aminoácidos			
YOR100C	CRC1	2,3	Transportador de carnitina a través de la membrana mitocondrial			
YNL015W	PBI2	2,2	Inhibidor citosólico de la proteinasa B vacuolar (PRB1)			
YNR066C	---	2,2	Proteína de membrana de función desconocida	•		
YOR306C	MCH5	2,1	Transportador de riboflavina de la membrana plasmática	•		•
YHR092C	HXT4	2,1	Transportador de glucosa de alta afinidad			
YGR166W	TRS65	2,1	Componente del complejo transportador de partículas de proteína	•		•
YLR417W	VPS36	2,0	Componente del complejo ESCRT-II			
Metabolismo de carbohidratos						
YJL153C	INO1	13,3	Inositol 1-fosfato sintasa			•
YPR160W	GPH1	6,8	Glucógeno fosforilasa implicada en la movilización del glucógeno			•
YPL088W	---	5,7	Arl alcohol deshidrogenasa putativa	•	•	•
YGR256W	GND2	5,5	6-fosfogluconato deshidrogenasa			
YGR248W	SOL4	4,1	6-fosfogluconolactonasa		•	
YGL156W	AMS1	3,0	Nanosidades implicada en la degradación de oligosacáridos libres (fOS)	•		•
YMR105C	PGM2	2,8	Cataliza la conversión de glucosa-1-P a glucosa-6-P		•	
YEL011W	GLC3	2,6	Proteína implicada en la acumulación de glucógeno			
YFR053C	HXK1	2,6	Isoenzima hexoquinasa 1			•
YJL155C	FBP26	2,5	Fructosa-2,6-bisfosfatasa	•	•	•
YLR258W	GSY2	2,4	Glucógeno sintasa inducida por la limitación de glucógeno			
YOR120W	GCY1	2,2	Glicerol deshidrogenasa			
YPR001W	CIT3	2,2	Citrato y metilcitrato sintasa mitocondrial con función dual			
YIL099W	SGA1	2,2	Glucoamilasa intracelular específica de la esporulación			
YGR087C	PDC6	2,1	Isoforma menor de la piruvato descarboxilasa			
YER062C	GPP2	2,1	DL-glicerol-3-P fosfatasa implicada en la biosíntesis de glicerol		•	•
YDL022W	GPD1	2,0	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD		•	
YIL107C	PFK26	2,0	6-fosfofructo-2-quinasa	•		•
YHR043C	DOG2	2,0	2-deoxiglucosa-6-fosfato fosfatasa			
Pared celular						
YKL163W	PIR3	18,8	Proteína O-glicosilada unida covalentemente a la pared celular	•	•	•
YKR091W	SRL3	7,3	Proteína que contiene un motivo GTB (G1 / S factor de transcripción vinculante)	•		•
YKL096W	CWP1	3,5	Manoproteína de la pared celular que se localiza en las cicatrices de nacimiento	•	•	•
YIR039C	YPS6	3,2	Aspártico proteasa putativa anclada a la pared celular	•	•	•
YKR061W	KTR2	3,0	Manosiltransferasa implicada en glicosilación de proteínas N	•		•
YDR055W	PST1	2,9	Proteína de la pared celular que contiene un sitio GPI	•	•	•
YLR121C	YPS3	2,9	Proteasa implicada en el mantenimiento de la pared celular	•	•	•
YLR194C	---	2,6	Componente de la estructura de la pared celular	•	•	•
YJL160C	PIR5	2,5	Proteína PIR de la pared celular			
YKL104C	GFA1	2,4	Glutamina-fructosa-6-P amidotransferasa de la biosíntesis de quitina	•	•	
YLR414C	PUN1	2,3	Proteína de membrana implicada en el mantenimiento de la pared celular	•	•	•
YER150W	SPI1	2,3	Proteína GPI implicada en la resistencia a acidez ambiental	•		

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	Descripción	RC	ZI	1
YGR032W	GSC2	2,2	Subunidad catalítica del complejo beta-1,3-glucán sintasa	•		•
YNL192W	CHS1	2,1	Quitín sintasa I	•		
YGR189C	CRH1	2,1	Quitín transglicosilasa que convierte quitina en beta-1,3 y beta-1,6-glucanos	•	•	•
YDR077W	SED1	2,0	Proteína GPI de la pared celular inducida por estrés		•	•
Transducción de señales						
YKL161C	KDX1	14,9	Protein quinasa de la ruta CWI, paróloga a SlT2	•	•	•
YGR043C	NQM1	10,6	Transaldolasa de función desconocida	•	•	•
YOR134W	BAG7	8,1	GAP de Rho1	•		•
YDR085C	AFR1	5,6	Proteína inducida por feromona que participan en el crecimiento pseudohifal	•	•	•
YGL121C	GPG1	3,8	Subunidad gamma de la proteína heterotrimérica G	•		•
YMR104C	YPK2	3,6	Protein quinasa similar a Ypk1	•		•
YGR023W	MTL1	2,7	Sensor de la membrana plasmática de la ruta CWI	•		•
YOR208W	PTP2	2,7	Fosfotirosina específica de fosfatasa involucrada en osmosensing	•	•	•
YHR030C	SLT2	2,7	MAP quinasa de la ruta de integridad de la pared celular	•	•	•
YDL214C	PRR2	2,7	Protein quinasa que inhibe la señalización por feromonas			
YCR073C	SSK22	2,3	MAP quinasa quinasa quinasa de la ruta HOG	•		•
YPL089C	RLM1	2,2	Factor de transcripción de la ruta CWI activado por SlT2	•		•
YGL248W	PDE1	2,0	Fosfodiesterasa de baja afinidad por AMPc	•		•
Metabolismo de aminoácidos						
YLR142W	PUT1	6,6	Proteína implicada en la utilización de prolina como fuente de nitrógeno			•
YBR117C	TKL2	6,3	Transketolasa			
YDR380W	ARO10	5,6	Fenil piruvato descarboxilasa	•		
YJL088W	ARG3	2,7	Omitina carbamoyltransferasa			
YGL184C	STR3	2,7	Cistationina beta-liasa peroxisomal			
YHR137W	ARO9	2,6	Aminotransferasa aromática II			
YMR250W	GAD1	2,6	Glutamato descarboxilasa			•
YJR078W	BNA2	2,5	Triptófano 2,3-dioxigenasa	•		
YKR076W	ECM4	2,3	Glutation transferasa de clase Omega			•
YNL277W	MET2	2,3	L-homoserina-O-acetiltransferasa			
Otras funciones						
YAL061W	BDH2	5,6	Alcohol deshidrogenasa putativa			
YDL085W	NDE2	3,7	NADH deshidrogenasa externa a la mitocondria			
YOR374W	ALD4	3,3	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial		•	•
YML054C	CYB2	3,0	Citocromo b2			
YPL171C	OYE3	2,8	NADPH oxidoreductasa conservada			
YDL130W-A	STF1	2,4	Proteína implicada en la regulación de la F1F0-ATP sintetasa	•		
YPR151C	SUE1	2,4	Proteína implicada en la degradación de formas inestables de citocromo c			
YDL181W	INH1	2,3	Proteína que inhibe la hidrólisis del ATP por la F1F0 sintasa			
YDL222C	FMP45	13,9	Proteína necesaria para la esporulación y el mantenimiento de esfingolípidos			•
YNL194C	---	11,1	Proteína necesaria para la esporulación y el mantenimiento de esfingolípidos			•
YHR209W	CRG1	9,5	Metiltransferasa que participa en la homeostasis de lípidos	•	•	•
YGL205W	POX1	4,6	Ácido graso acil Coenzima A oxidasa			
YIL160C	POT1	2,8	3-Quetoacil-CoA			
YNL202W	SPS19	2,3	2,4-dienoil-CoA-reductasa peroxisomal			
YPL110C	GDE1	2,2	Glicerol fosfolina fosfodiesterasa	•		•
YHR160C	PEX18	2,2	Peroxina; requerida para señalizar las proteínas de la matriz ribosomal			
YJL108C	PRM10	6,0	Proteína regulada por la presencia de feromonas, implicada en la filamentacion	•	•	•

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	Descripción	RC	ZI	1
YIL117C	PRM5	4,3	Proteína inducida por la ruta CWI en presencia de feromona	•	•	•
YDL223C	HBT1	3,8	Proteína de <i>Sshmo</i> , sustrato de Hub1p			•
YEL059C-A	SOM1	2,1	Subunidad de la peptidasa de la membrana mitocondrial interior			•
YBR230C	OM14	2,0	Receptor de la membrana mitocondrial de ribosomas citosólicos			
YMR238W	DFG5	2,0	Manosidasa putativa	•	•	•
YDL204W	RTN2	4,8	Proteína implicada en el mantenimiento de la estructura del RE			•
YBL078C	ATG8	3,0	Miembro de autofagosomas y vesículas Ctv	•		
YHR138C	---	2,1	Proteína de función desconocida	•		•
YLR178C	TFS1	2,8	Inhibidor de la carbopeptidasa Y (Prc1p) y de la GAP de Ras Ira2			
YEL060C	PRB1	2,1	Proteinasa B vacuolar con actividad endopeptidasa H3 N-terminal	•	•	•
YLL039C	UBI4	2,0	Ubiquitina	•		•
YPL052W	OAZ1	2,0	Regulador de la ornitina descarboxilasa Spe1	•		
YDL024C	DIA3	3,9	Proteína de función desconocida, que participan en el crecimiento pseudohifal			
YHR087W	RTC3	7,4	Proteína de función desconocida implicada en el metabolismo de RNA	•	•	•
YOR173W	DCS2	3,2	Regulador de pirofosfato		•	•
YPL123C	RNY1	2,1	RNAsa vacuolar de la familia T(2)			
YHR139C	SPS100	14,6	Proteína necesaria para la maduración de la espora			
YHL022C	SPO11	2,5	Proteína específica del proceso de recombinación meiótica	•		
YOL047C	LDS2	2,4	Proteína implicada en el ensamblaje de la pared de la espora			
YNL294C	RIM21	2,2	Sensor de pH, componente de la ruta Rim101	•	•	
YOR177C	MPC54	2,2	Componente de la placa exterior meiótica			
YGR059W	SPR3	2,0	Homólogo de la familia de genes CDC3/10/11/12 específico de esporulación			
YIR017C	MET28	2,9	Activador transcripcional del complejo Cbf1p-Met4p-Met28p			
YJL089W	SIP4	2,3	Activador transcripcional del cluster de zinc C6			
YDR277C	MTH1	2,2	Regulador negativo de la ruta de señalización de la glucosa			
Función desconocida						
YMR107W	SPG4	18,6	Proteína necesaria para la supervivencia a alta tª durante la fase estacionaria			•
YDR034W-B	---	14,3	Proteína anclada en la membrana plasmática	•		•
YOL084W	PHM7	8,4	Proteína de función desconocida			•
YDR070C	FMP16	7,0	Proteína de función desconocida	•		•
YJL107C	---	6,0	Proteína putativa de función desconocida	•	•	•
YGR052W	FMP48	5,7	Proteína putativa de función desconocida		•	
YML128C	MSC1	5,6	Proteína de función desconocida	•	•	•
YBR285W	---	4,7	Proteína putativa de función desconocida			
YPL054W	LEE1	4,5	Proteína con dedos de zinc de función desconocida	•		
YLR327C	TMA10	4,0	Proteína de función desconocida asociada a los ribosomas	•	•	•
YIL057C	RGI2	3,9	Proteína de función desconocida			
YLR267W	BOP2	3,8	Proteína de función desconocida	•		•
YJL161W	FMP33	3,6	Proteína putativa de función desconocida	•	•	•
YOL159C	---	3,5	Proteína soluble de función desconocida	•		•
YPR078C	---	3,5	Proteína putativa de función desconocida	•		
YNL195C	---	3,3	Proteína de función desconocida			
YNR034W-A	---	3,3	Proteína putativa de función desconocida			
YGR066C	---	3,3	Proteína putativa de función desconocida			
YKL107W	---	3,2	Deshidrogenasa reductasa putativa	•		
YHR140W	---	3,2	Proteína integral de la membrana plasmática de función desconocida			
YER067W	RGI1	3,1	Proteína de función desconocida			

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	Descripción	RC	ZI	1
YGR174W-A	---	3,1	Proteína putativa de función desconocida	•		
YFL061W	DDI2	3,0	Proteína de función desconocida			
YLR149C	---	2,9	Proteína de función desconocida	•		
YBR085C-A	---	2,9	Proteína de función desconocida			
YNL058C	---	2,9	Proteína putativa de función desconocida	•	•	
YEL073C	---	2,8	Proteína putativa de función desconocida			
YDR018C	---	2,8	Probable proteína de membrana	•		
YLR031W	---	2,7	Proteína putativa de función desconocida	•		
YHL021C	AIM17	2,7	Proteína putativa de función desconocida			
YOR161C	PNS1	2,6	Proteína de función desconocida		•	
YMR196W	---	2,5	Proteína putativa de función desconocida			•
YLR312C	---	2,5	Proteína putativa de función desconocida	•		
YMR090W	---	2,5	Proteína putativa de función desconocida		•	
YMR118C	SHH3	2,5	Proteína putativa de la membrana mitocondrial	•		
YEL057C	---	2,4	Proteína de función desconocida implicada en el mantenimiento del telómero			
YML131W	---	2,4	Proteína de función desconocida		•	
YOR289W	---	2,4	Proteína de función desconocida	•		
YIL029C	---	2,4	Proteína putativa de función desconocida			
YHR097C	---	2,3	Proteína putativa de función desconocida	•	•	•
YKR046C	PET10	2,3	Proteína de función desconocida localizada en partículas lipídicas	•		•
YBL049W	MOH1	2,3	Proteína de función desconocida			
YCR099C	---	2,3	Proteína de función desconocida	•		•
YBR076W	ECM8	2,2	Proteína de función desconocida			
YBR056W-A	---	2,2	Proteína de función desconocida	•		•
YJR008W	MHO1	2,2	Proteína de función desconocida	•		
YPL067C	---	2,2	Proteína putativa de función desconocida	•		•
YJL103C	GSM1	2,2	Cluster de zinc de función desconocida			
YIL108W	---	2,1	Metaloendopeptidasa putativa	•	•	•
YCL049C	---	2,1	Proteína de función desconocida		•	
YGL258W-A	---	2,1	Proteína putativa de función desconocida			
YJL163C	---	2,1	Proteína putativa de función desconocida			
YGR149W	---	2,0	Proteína putativa de función desconocida		•	
YDL169C	UGX2	2,0	Proteína de función desconocida			
YDL057W	---	2,0	Proteína putativa de función desconocida	•		
YPL272C	PBI1	2,0	Proteína putativa de función desconocida	•		
YNL115C	---	2,0	Proteína putativa de función desconocida			
YPR159C-A	---	2,0	Proteína de función desconocida			

TABLA SUPLEMENTARIA 2. Clasificación funcional, descripción y comparación de los genes que se inducen en presencia de aminocandina. Los valores mostrados corresponden al valor medio de inducción al comparar los perfiles transcripcionales en presencia y ausencia de aminocandina (AMC) (15 ng/ml) durante 2 horas en 3 experimentos independientes. Los grupos funcionales, así como la descripción de los ORFs, fueron asignados según la información obtenida en la base de datos informática SGD. Los genes inducidos (ratio +/- droga ≥ 2) en presencia de caspofungina (CAS) están señalados en negrita.

ORF	Gen	WT AMC (+/-)	WT CAS (+/-)	Descripción
Respuesta a estrés				
YFL014W	HSP12	25,86	13,26	Proteína implicada en el mantenimiento de la organización de la membrana
YMR169C	ALD3	21,16	8,88	Aldehído deshidrogenasa citoplásmica
YPL223C	GRE1	11,77	6,39	Hydrophilina esencial en el proceso de desecación-rehidratación
YGR213C	RTA1	10,95	4,03	Proteína implicada en la resistencia al 7-aminocolesterol
YOL052C-A	DDR2	9,43	6,99	Proteína de respuesta a múltiples estreses
YMR175W	SIP18	8,97	10,47	Fosfolípido de unión a hidrofiliina
YGR088W	CTT1	8,46	5,45	Catalasa citosólica T
YDR453C	TSA2	7,21	4,54	Tiorredoxina peroxidasa citoplásmica inducida por estrés
YBR072W	HSP26	6,30	3,15	Pequeña proteína de choque térmico (sHSP) con actividad chaperona
YMR096W	SNZ1	4,84	2,41	Proteína implicada en la biosíntesis de la vitamina B6
YMR095C	SNO1	4,77	3,03	Proteína implicada en el metabolismo de la piridoxina
YMR174C	PAI3	3,93	3,97	Inhibidor de proteinasa A citoplasmática (Pep4p)
YPR005C	HAL1	3,81	2,46	Proteína citoplasmática involucrada en halotolerancia
YIL101C	XBP1	3,49	3,16	Represor transcripcional que se une promotor de genes de ciclina
YNR064C	---	3,47	1,93	Miembro de la familia alfa-beta hidrolasa
YGR144W	THI4	3,31	2,91	Proteína implicada en la formación del resto tiazol
YBR203W	COS111	2,68	2,20	Proteína necesaria para la resistencia al fármaco antifúngico Ciclopirox olamina
YLR251W	SYM1	2,59	1,86	Proteína necesaria para el metabolismo de etanol
YBR054W	YRO2	2,50	1,22	Proteína implicada en la respuesta a estrés por acidificación
YDL243C	AAD4	2,47	2,34	Deshidrogenasa putativa involucrada en la respuesta al estrés oxidativo
YMR040W	YET2	2,44	2,22	Proteína de función desconocida que puede interactuar con los ribosomas
YOL151W	GRE2	2,42	1,92	Metilgloxal reductasa dependiente de NADHP
YGR008C	STF2	2,37	2,10	Proteína implicada en la resistencia al estrés por desecación
YDR001C	NTH1	2,35	2,01	trehalasa neutral, degrada trehalosa
YKL093W	MBR1	2,31	1,51	Proteína mitocondrial implicada en la respuesta a estrés
YDR074W	TPS2	2,30	2,33	Subunidad fosfatasa del complejo sintasa trehalosa-6-P
YER037W	PHM8	2,25	2,04	Ácido lisofosfatídico (LPA) fosfatasa
YKL026C	GPX1	2,25	1,84	Hidropéroxido glutathion peroxidas inducida en ausencia de glucosa
YBL064C	PRX1	2,24	1,97	Peroxina; requerida para la orientación de proteínas de la matriz del peroxisoma
YCR104W	PAU3	2,23	2,32	Miembro de la familia de genes múltiples seripauperin
YDR533C	HSP31	2,18	2,18	Metilgloxalasa que convierte metilgloxal a D-lactato
YDL110C	TMA17	2,18	2,45	Chaperona ATPasa que se adapta al montaje del proteasoma en estrés
YML100W	TSL1	2,11	2,11	Subunidad grande del complejo trehalosa sintasa-6-fosfato
YPL230W	USV1	2,07	1,95	Factor de transcripción putativo que contiene dedos de zinc
YNL036W	NCE103	2,04	1,66	Metaloenzima que cataliza la hidratación del CO ₂ a bicarbonato
YML058W-A	HUG1	2,02	1,52	Proteína implicada en la respuesta al daño en el ADN
YFL056C	AAD6	2,01	1,39	Aril-alcohol deshidrogenasa putativa
Transporte				
YHR096C	HXT5	71,02	38,25	Transportador de hexosa con una afinidad moderada por la glucosa
YNR002C	ATO2	11,30	7,47	Proteína putativa transmembrana involucrada en la exportación de amoniaco

ORF	Gen	WT AMC (+/-)	WT CAS (+/-)	Descripción
YNL093W	YPT53	11,09	4,90	GTPasa de la familia Rab inducida por el estrés
YDR536W	STL1	5,61	6,62	Simportador de glicerol de la membrana plasmática
YGR243W	MPC3	4,56	3,77	Subunidad altamente conservada del transportador mitocondrial del piruvato
YDR342C	HXT6	3,95	2,90	Transportador de glucosa de alta afinidad
YGR138C	TPO2	3,93	1,00	Transportador de poliamina
YOR348C	PUT4	3,77	3,83	Proteína de alta afinidad necesaria para el transporte de la prolina
YHR092C	HXT4	3,57	2,09	Transportador de glucosa de alta afinidad
YNR065C	---	3,43	2,86	Proteína de función desconocida
YCR010C	ADY2	3,27	2,65	Transportador de acetato requerida para una esporulación normal
YBR294W	SUL1	2,99	2,91	Sulfato permeas de alta afinidad de la familia de transportadores de aniones SulP
YOR306C	MCH5	2,74	2,11	Transportador de riboflavina de la membrana plasmática
YKL217W	JEN1	2,73	2,57	Simportador del protón monocarboxilato de la membrana plasmática
YNR066C	---	2,71	2,16	Proteína de función de función desconocida localizada en la membrana
YGR121C	MEP1	2,69	2,38	Permeasa de amonio
YAL053W	FLC2	2,65	2,41	Canal de calcio
YIL023C	YKE4	2,42	3,04	Transportador de zinc; se localiza en el RE
YLR080W	EMP46	2,42	1,74	Componente de la membrana del RE
YPR194C	OPT2	2,40	2,91	Transportador de oligopéptidos
YBR147W	RTC2	2,39	1,62	Transportador en la membrana de aminoácidos catiónicos
YNL015W	PBI2	2,38	2,23	Inhibidor de la proteinasa citosólica vacuolar B (PRB1)
YGR166W	TRS65	2,36	2,08	Componente del transporte del complejo II de proteínas (Trapp)
YMR192W	GYL1	2,18	1,84	Putative GTPasa implicada en procesos de exocitosis
YDL234C	GYP7	2,14	1,68	GTPasa activadora de miembros de la familia Rab
YNL293W	MSB3	2,13	2,66	GTPasa Rab que regula la endocitosis
YOR328W	PDR10	2,13	1,44	Proteína de membrana de unión al ATP
YCL069W	VBA3	2,09	4,46	Permeasa de aminoácidos básicos en la membrana vacuolar
YOL122C	SMF1	2,02	1,79	Transportador de iones con afinidad selectiva a metales divalentes y trivalentes
Metabolismo de carbohidratos				
YJL153C	INO1	41,30	13,27	Inositol 1-fosfato sintasa
YPL088W	---	11,31	5,66	Aril alcohol deshidrogenasa putativa
YPR160W	GPH1	9,44	6,85	Glucógeno fosforilasa requerida para la movilización del glucógeno
YGR256W	GND2	6,42	5,46	6-fosfogluconato deshidrogenasa
YGR248W	SOL4	4,76	4,10	6-fosfogluconolactonasa
YMR105C	PGM2	4,29	2,80	Cataliza la conversión de glucosa-1-P a glucosa-6-P
YGL156W	AMS1	4,22	2,98	Manosidasa que participa en la degradación de oligosacáridos libres (fOS)
YOR120W	GCY1	3,52	2,21	Glicerol deshidrogenasa
YFR053C	HXK1	3,42	2,58	Hexoquinasa isoenzima 1
YLR258W	GSY2	3,09	2,35	Glucógeno sintasa; su expresión es inducida por la limitación de glucosa
YJL155C	FBP26	2,80	2,45	Fructosa-2,6-bisfosfatasa
YEL011W	GLC3	2,75	2,58	Enzima implicada en la ramificación del glucógeno para la acumulación de este
YJL052W	TDH1	2,71	1,74	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa envuelta en glucolisis y gluconeogenesis
YPR184W	GDB1	2,56	1,92	Enzima necesaria para la degradación del glucógeno
YIR038C	GTT1	2,40	1,82	Glutathion S-transferasa implicada en homodimerización
YER062C	GPP2	2,36	2,06	DL-glicerol-3-P fosfatasa implicada en la biosíntesis de glicerol
YDL021W	GPM2	2,36	1,81	Fosfoglicerato mutasa homóloga de Gpm1p
YBR006W	UGA2	2,28	1,91	Proteína implicada en la utilización de γ -aminobutarato como fuente de nitrógeno
YIL107C	PFK26	2,21	2,02	6-fosfofructo-2-quinasa

ORF	Gen	WT AMC (+/-)	WT CAS (+/-)	Descripción
<i>YDL022W</i>	<i>GPD1</i>	2,18	2,03	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD
<i>YIL099W</i>	<i>SGA1</i>	2,17	2,18	Glucoamilasa intracelular específica de esporulación
<i>YFR017C</i>	<i>IGD1</i>	2,16	1,80	Proteína citoplásmica inhibidora de Gdb1p (desensamblaje de glucógeno)
<i>YER054C</i>	<i>GIP2</i>	2,13	N.D.	Subunidad reguladora de Glc7p
<i>YGL157W</i>	<i>ARI1</i>	2,13	1,70	Miembro de cadena corta de la superfamilia dehidrogenasa / reductasa
<i>YFR015C</i>	<i>GSY1</i>	2,12	1,93	Glucógeno sintetasa similar a Gsy2p
<i>YGL062W</i>	<i>PYC1</i>	2,07	1,50	Enzima citoplasmática que convierte piruvato en oxalacetato
<i>YPR001W</i>	<i>CIT3</i>	2,03	2,20	Sintasa metilcitrato mitocondrial de especificidad dual
<i>YNL274C</i>	<i>GOR1</i>	2,03	1,70	Glioxilato reductasa
Pared celular				
<i>YKL163W</i>	<i>PIR3</i>	47,27	18,79	Proteína O-glicosilada de la pared celular unida covalentemente
<i>YKR091W</i>	<i>SRL3</i>	10,41	7,27	Proteína que contiene un motivo GTB (G1 / S factor de transcripción vinculante)
<i>YER150W</i>	<i>SPI1</i>	6,47	2,33	Proteína de anclaje GPI implicada en la resistencia ácidos débiles
<i>YLR194C</i>	---	6,25	2,57	Constituyente estructural de la pared celular
<i>YDR055W</i>	<i>PST1</i>	5,80	2,93	Proteína de la pared celular que contiene un sitio GPI
<i>YGR032W</i>	<i>GSC2</i>	5,21	2,24	Subunidad catalítica de la β -1,3-glucan sintasa
<i>YLR121C</i>	<i>YPS3</i>	4,19	2,88	Miembro de la familia de proteasas implicadas en el mantenimiento de la pared
<i>YLR414C</i>	<i>PUN1</i>	3,96	2,34	Proteína de la membrana plasmática con papel en la integridad de la pared
<i>YKR061W</i>	<i>KTR2</i>	3,96	2,96	Manosiltransferasa implicada en la glicosilación de proteínas
<i>YKL096W</i>	<i>CWP1</i>	3,79	3,50	Manoproteína de la pared celular que se localiza en las cicatrices de nacimiento
<i>YIR039C</i>	<i>YPS6</i>	3,33	3,15	GPI aspártico proteasa
<i>YJL160C</i>	<i>PIR5</i>	2,94	2,55	Miembros de la familia PIR de proteínas de la pared celular
<i>YNL192W</i>	<i>CHS1</i>	2,81	2,14	Quitina sintasa I
<i>YGR189C</i>	<i>CRH1</i>	2,66	2,06	Quitina transglicosilasa; transforma quitina en β (1-6) y (1-3) glucanos
<i>YNL160W</i>	<i>YGP1</i>	2,52	1,71	Glicoproteína de función secretora en la pared celular
<i>YKL104C</i>	<i>GFA1</i>	2,51	2,40	Glutamina-fructosa-6-P amidotransferasa de la biosíntesis de quitina
<i>YEL058W</i>	<i>PCM1</i>	2,36	1,88	N-acetilglucosamina-phosphato mutasa implicada en la biosíntesis de quitina
<i>YDR077W</i>	<i>SED1</i>	2,31	2,03	Glicoproteína GPI de la pared celular inducida por el estrés
<i>YBR005W</i>	<i>RCR1</i>	2,24	1,24	Proteína del RE implicada en la reposición de quitina
<i>YDR261C</i>	<i>EXG2</i>	2,08	1,89	Exo-1,3-beta-glucanasa necesaria para el ensamblaje de beta-glucano
Transducción de señales				
<i>YKL161C</i>	<i>KDX1</i>	41,39	14,91	Proteín quinasa de la ruta de la integridad de la pared celular
<i>YOR134W</i>	<i>BAG7</i>	24,17	8,07	GTPasa GAP de Rho
<i>YGR043C</i>	<i>NQM1</i>	22,13	10,57	Transaldolasa de función desconocida
<i>YDR085C</i>	<i>AFR1</i>	9,76	5,63	Proteína necesaria para la formación de proyección de feromona inducida
<i>YMR104C</i>	<i>YPK2</i>	4,64	3,63	Proteín quinasa similar a la proteína serina / treonina quinasa Ypk1
<i>YGL121C</i>	<i>GPG1</i>	4,28	3,84	Subunidad gamma de la proteína G heterotrimerica
<i>YHR030C</i>	<i>SLT2</i>	3,46	2,67	MAP quinasa de la ruta de integridad de la pared celular
<i>YOR208W</i>	<i>PTP2</i>	3,17	2,70	Fosfotirosina específica de fosfatasa involucrada en osmosensing
<i>YCR073C</i>	<i>SSK22</i>	2,97	2,32	MAP quinasa quinasa quinasa de la ruta HOG1
<i>YDL214C</i>	<i>PRR2</i>	2,77	2,67	Proteín quinasa que inhibe la señalización inducida por feromonas
<i>YGR023W</i>	<i>MTL1</i>	2,70	2,73	Sensor de la membrana plasmática implicada en la señalización de la ruta CWI
<i>YGR161C</i>	<i>RTS3</i>	2,66	1,70	Componente del complejo proteína fosfatasa tipo II
<i>YPL089C</i>	<i>RLM1</i>	2,50	2,22	Factor de transcripción MADS-box activado por la MAP-quinasa Slit2p
<i>YOL016C</i>	<i>CMK2</i>	2,32	1,30	Calmodulin-dependent protein kinase, may play a role in stress response
<i>YBR050C</i>	<i>REG2</i>	2,15	1,69	Subunidad reguladora de Glc7p
<i>YNL053W</i>	<i>MSG5</i>	2,06	1,84	Protein fosfatasa que regula y es regulada por Slit2p

ORF	Gen	WT AMC (+/-)	WT CAS (+/-)	Descripción
YLR120C	YPS1	2,05	1,64	Aspártico proteasa
YGR070W	ROM1	2,03	1,71	GEF de Rho1
YGL248W	PDE1	2,00	2,04	Fosfodiesterasa de baja afinidad por el AMPc
Metabolismo de aminoácidos				
YLR142W	PUT1	10,74	6,61	Proteína implicada en la utilización de prolina como única fuente de nitrógeno
YBR117C	TKL2	10,38	6,32	TransKetolasa
YDR380W	ARO10	6,30	5,57	Fenilpiruvato descarboxilasa
YJL088W	ARG3	4,98	2,68	Ornitina carbamoiltransferasa
YMR250W	GAD1	3,45	2,56	Glutamato descarboxilasa
YJR078W	BNA2	3,17	2,54	Triptófano 2,3-dioxigenasa o indoleamine 2,3-dioxigenasa
YGL184C	STR3	3,00	2,68	Cistationina beta-liasa del peroxisoma
YKR076W	ECM4	2,96	2,30	Glutation transferasa de la clase Omega
YER081W	SER3	2,60	1,60	Cataliza el primer paso de la síntesis de serina y glicina
YOL058W	ARG1	2,38	0,93	Arginosucinato sintetasa
YKL218C	SRY1	2,29	1,27	Cataliza la formación de amonio y oxalacetato
YHR137W	ARO9	2,28	2,62	Aminotransferasa aromática II
YFL030W	AGX1	2,13	1,71	Cataliza la síntesis de glicina desde el glioxilato
YJR010W	MET3	2,05	1,88	Cataliza el primer paso de la activación intracelular del sulfato
Otras funciones				
YAL054C	ACS1	2,01	1,80	Acetyl-coA sintetasa
YNR001C	CIT1	2,01	1,80	Citrato sintasa
YAL061W	BDH2	7,78	5,57	Proteína putativa de la cadena de la alcohol deshidrogenasa
YML054C	CYB2	5,06	3,01	Citocromo b2 (citocromo c oxidoreductasa-L-lactato)
YDL085W	NDE2	4,12	3,69	NADH deshidrogenasa del exterior de la mitocondria
YOR374W	ALD4	3,74	3,29	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial
YPL171C	OYE3	3,16	2,79	Oxidoreductasa NADPH conservada
YDL181W	INH1	2,95	2,26	Proteína que inhibe la hidrólisis de ATP por la ATP sintasa F1F0
YKL151C	---	2,60	N.D.	Proteína putativa de función desconocida
YDL130W-A	STF1	2,44	2,39	Proteína implicada en la regulación de la sintasa F1F0-ATP mitocondrial
YMR315W	---	2,27	1,91	Proteína con actividad oxidoreductasa
YPR151C	SUE1	2,18	2,39	Proteína necesaria para la degradación de formas inestables de citocromo c
YNL009W	IDP3	2,12	1,97	Isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente
YNL194C	---	24,43	11,08	Proteína implicada en la esporulación y el mantenimiento de los esfingolípidos
YDL222C	FMP45	21,57	13,92	Proteína implicada en la esporulación y el mantenimiento de los esfingolípidos
YHR209W	CRG1	16,05	9,50	Metiltransferasa implicada en la homeostasis de lípidos
YGL205W	POX1	7,51	4,63	Coenzima A oxidasa de ácidos grasos
YIL160C	POT1	4,14	2,75	3-cetoacil-CoA tiolasa con amplia especificidad de longitud de cadena
YER015W	FAA2	2,64	1,81	Acyl-CoA sintetasa
YNL202W	SPS19	2,63	2,26	Reductasa 2,4-dienoil-CoA del peroxisoma
YMR008C	PLB1	2,28	1,63	Fosfolipasa B implicada en el metabolismo de lípidos
YPL110C	GDE1	2,17	2,21	Glicerofosfocolina (GroPCho) fosfodiesterasa
YPL057C	SUR1	2,13	1,54	Subunidad catalítica de la manosilinositol fosforilceramida sintasa
YKR053C	YSR3	2,13	1,27	Fosfatasa implicada en el metabolismo de esfingolípidos
YHR160C	PEX18	2,13	2,18	Peroxina; requerida para la orientación de proteínas de la matriz del peroxisoma
YDL223C	HBT1	7,15	3,83	Proteína tipo Shmoo, sustrato de la proteína ubiquitina Hub1p
YIL117C	PRM5	6,74	4,26	Proteína regulada por feromonas
YJL108C	PRM10	6,72	5,97	Proteína regulada por feromonas

ORF	Gen	WT AMC (+/-)	WT CAS (+/-)	Descripción
YPR002W	PDH1	2,54	1,58	Proteína mitocondrial implicada en la respiración
YGR110W	CLD1	2,36	1,74	Fosfolipasa mitocondrial
YIL136W	OM45	2,29	1,98	Proteína de función desconocida
YBR230C	OM14	2,28	2,03	Receptor de la membrana mitocondrial externa de los ribosomas citosólicos
YMR124W	EPO1	2,09	1,58	Proteína implicada en la septina del RE
YBR214W	SDS24	2,08	1,87	Proteína homóloga de Sds23 de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
YDL204W	RTN2	7,05	4,76	Proteína implicada en el mantenimiento de la morfología tubular del RE
YBL078C	ATG8	3,24	2,98	Componente de autofagosomas y vesículas Cvt
YHR138C	---	2,90	2,10	Proteína de función desconocida
YOR152C	ATG40	2,14	1,53	Receptor asociado a la autofagia en el RE
YOL083W	ATG34	2,10	1,80	Proteína receptora implicada en autofagia selectiva en ausencia de glucosa
YLR178C	TFS1	5,17	2,79	Inhibidor de la carboxipeptidasa Y (Prc1p), y de la GAP de Ras (Ira2p)
YLL039C	UBI4	3,06	2,04	Ubiquitina
YPR030W	CSR2	2,66	1,70	Ubiquitina nuclear ligasa
YEL060C	PRB1	2,61	2,09	Proteinasa B vacuolar con actividad endopeptidasa H3 N-terminal
YPL052W	OAZ1	2,32	2,00	Regulador de la ornitina descarboxilasa Spe1
YBR280C	SAF1	2,29	1,87	Proteína implicada en la degradación de Aah1p
YBR169C	SSE2	2,07	1,56	Miembro de la familia de proteínas de shock térmico
YER103W	SSA4	2,07	1,38	Juega un papel en el transporte transmembrana de proteínas
YOR302W	---	2,08	1,53	Regula el traslado del ARNm CPA1
YDL024C	DIA3	3,99	3,86	Proteína de función desconocida, que participan en el crecimiento pseudohifal
YHR087W	RTC3	10,84	7,38	Proteína de función desconocida que participa en el metabolismo del ARN
YOR173W	DCS2	4,59	3,18	Pirfosfatasa reguladora de (7) GpppX
YPL123C	RNY1	2,74	2,08	Rnasa vacuolar de la familia T2
YML118W	NGL3	2,46	1,90	3'-5' exonucleasa específica para poli-A ARNs
YHR139C	SPS100	27,43	14,65	Proteína necesaria para la maduración de la pared de esporas
YNL294C	RIM21	2,29	2,22	Sensor de pH, componente de la ruta Rim101
YHL022C	SPO11	2,18	2,52	Proteína específica de meiosis que inicia la recombinación meiótica
YOL048C	RRT8	2,04	1,64	Proteína implicada en el ensamblaje de la pared de las esporas
YDR277C	MTH1	3,19	2,24	Regulador negativo de la señalización de la ruta de la glucosa
YMR280C	CAT8	2,74	1,76	Activador de genes para el crecimiento con fuentes de carbono no fermentables
YGR097W	ASK10	2,42	1,74	Componente del holoenzima RNAPolimerasa II
YKL062W	MSN4	2,37	1,86	Activador transcripcional de Msn2
YBR182C	SMP1	2,11	1,75	Factor de transcripción implicado en la respuesta a estrés osmótico
YDR259C	YAP6	2,07	1,47	Factor de transcripción
YDR216W	ADR1	2,05	1,77	Factor de transcripción implicado en la asimilación del carbono
YMR136W	GAT2	2,03	1,43	Proteína que contiene un motivos GATA
Función desconocida				
YDR034W-B	---	48,87	14,25	Proteína GPI de la membrana plasmática
YMR107W	SPG4	46,54	18,63	Proteína necesaria para la supervivencia a alta temperatura en fase estacionaria
YOL084W	PHM7	14,16	8,41	Proteína de función desconocida
YML128C	MSC1	11,71	5,63	Proteína de función desconocida
YDR070C	FMP16	10,24	7,02	Proteína de función desconocida
YLR327C	TMA10	7,15	3,96	Proteína de función desconocida que se asocia con los ribosomas
YGR052W	FMP48	6,80	5,67	Proteína de función desconocida
YLR267W	BOP2	6,34	3,83	Proteína de función desconocida
YBR285W	---	6,20	4,68	Proteína de función desconocida
YJL107C	---	6,09	6,03	Proteína de función desconocida

ORF	Gen	WT AMC (+/-)	WT CAS (+/-)	Descripción
YHR140W	---	5,89	3,18	Proteína putativa integral de membrana de función desconocida
YKR046C	PET10	5,69	2,27	Proteína de función desconocida que se localiza en partículas lipídicas
YBR056W-A	---	5,63	2,24	Proteína de función desconocida
YPL272C	PBI1	5,62	2,02	Proteína de función desconocida
YLR054C	OSW2	4,91	1,72	Proteína de función desconocida para el ensamblaje de la pared de las esporas
YJL161W	FMP33	4,89	3,56	Proteína de función desconocida
YNR034W-A	---	4,58	3,30	Proteína de función desconocida
YER067W	RGI1	4,54	3,14	Proteína de función desconocida
YHL021C	AIM17	4,35	2,65	Proteína de función desconocida
YKL107W	---	4,25	3,20	Deshidrogenasa / reductasa de cadena corta
YNL058C	---	4,18	2,89	Proteína de función desconocida
YMR316W	DIA1	4,07	1,44	Proteína de función desconocida
YLR149C	---	4,05	2,94	Proteína de función desconocida
YMR196W	---	4,01	2,49	Proteína de función desconocida
YOL159C	---	3,98	3,46	Proteína soluble de función desconocida
YPL054W	LEE1	3,93	4,48	Proteína de función desconocida
YLR031W	---	3,81	2,71	Proteína de función desconocida
YNL195C	---	3,76	3,33	Proteína de función desconocida
YEL073C	---	3,71	2,79	Proteína de función desconocida
YPR078C	---	3,52	3,46	Proteína de función desconocida
YBR085C-A	---	3,36	2,90	Proteína de función desconocida
YMR090W	---	3,27	2,47	Proteína de función desconocida
YHR097C	---	3,16	2,28	Proteína de función desconocida
YJR008W	MHO1	3,13	2,20	Proteína de función desconocida
YLR346C	CIS1	3,10	1,67	Proteína de función desconocida localizada en la mitocondria
YGR066C	---	2,99	3,28	Proteína de función desconocida
YMR085W	---	2,98	1,74	Proteína putativa de función desconocida
YLR312C	---	2,91	2,48	Proteína de función desconocida
YOR161C	PNS1	2,90	2,60	Proteína de función desconocida
YGR201C	---	2,86	1,79	Proteína putativa de función desconocida
YOR289W	---	2,82	2,37	Proteína de función desconocida
YMR084W	---	2,79	1,64	Proteína putativa de función desconocida
YPL067C	---	2,77	2,19	Proteína de función desconocida
YJL103C	GSM1	2,76	2,17	Proteína de función desconocida del cluster de zinc
YMR251W-A	HOR7	2,75	1,81	Proteína de función desconocida
YGR236C	SPG1	2,67	1,98	Proteína para la supervivencia a alta temperatura durante la fase estacionaria
YJL144W	---	2,67	1,47	Hidrofilina citoplasmática de función desconocida
YHR033W	---	2,64	1,68	Proteína de función desconocida
YIL057C	RGI2	2,63	3,86	Proteína de función desconocida
YDR018C	---	2,61	2,76	Proteína de función desconocida
YMR081C	ISF1	2,58	1,92	Proteína hidrolítica similar a Mbr1p
YIL108W	---	2,55	2,13	Metaloendopeptidasa putativa
YDL169C	UGX2	2,55	2,03	Proteína de función desconocida
YKL071W	---	2,54	1,50	Proteína putativa de función desconocida
YOR019W	---	2,51	1,69	Proteína de función desconocida
YML131W	---	2,50	2,37	Proteína de función desconocida
YEL057C	---	2,49	2,44	Proteína de función desconocida relacionada con los telómeros

ORF	Gen	WT AMC (+/-)	WT CAS (+/-)	Descripción
YMR194C-B	CMC4	2,47	1,89	Proteína localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria
YJL132W	---	2,47	1,85	Proteína putativa de función desconocida
YBR033W	EDS1	2,46	1,92	Proteína de función desconocida
YOR220W	RCN2	2,44	1,64	Proteína putativa de función desconocida
YGL053W	PRM8	2,44	1,64	Feromona reguladora de proteínas
YPL186C	UIP4	2,42	1,82	Proteína de función desconocida que interactúa con Ulp1p
YOR137C	SIA1	2,40	1,91	Proteína activadora de la ATPasa Pma1p de la membrana plasmática
YKL133C	---	2,39	1,87	Proteína putativa de función desconocida
YGR149W	---	2,33	2,05	Proteína de función desconocida
YNR014W	---	2,30	1,94	Proteína putativa de función desconocida
YBR071W	---	2,30	1,34	Proteína de función desconocida
YCR099C	---	2,19	2,25	Proteína de función desconocida
YGR174W-A	---	2,19	3,11	Proteína de función desconocida
YCL012C	---	2,19	1,77	Proteína de función desconocida
YCR101C	---	2,17	1,88	Proteína putativa de función desconocida
YPL222W	FMP40	2,16	1,78	Proteína de función desconocida
YJL213W	---	2,16	1,70	Proteína de función desconocida
YCL049C	---	2,15	2,08	Proteína de función desconocida
YDR540C	IRC4	2,11	1,93	Proteína putativa de función desconocida
YJL016W	---	2,09	1,47	Proteína putativa de función desconocida
YGL258W-A	---	2,09	2,07	Proteína de función desconocida
YOR385W	---	2,09	1,03	Proteína putativa de función desconocida
YNL092W	---	2,08	1,81	Metiltransferasa putativa dependiente de adenosilmetionina
YPL119C-A	---	2,06	1,85	Proteína putativa de función desconocida
YDL246C	SOR2	2,06	1,54	Proteína putativa de función desconocida
YIL029C	---	2,05	2,35	Proteína de función desconocida
YLL056C	---	2,02	1,61	Proteína putativa de función desconocida
YLR271W	CMG1	2,02	1,86	Proteína putativa de función desconocida
YBR056W	---	2,02	1,80	Proteína putativa de función desconocida
YHR112C	---	2,02	1,70	Proteína de función desconocida
YNL115C	---	2,01	2,02	Proteína de función desconocida

TABLA SUPLEMENTARIA 3. Comparación de los genes cuya expresión se induce en presencia de caspofungina en una cepa silvestre con la observada en los mutantes *slt2Δ* y *rlm1Δ*. Los valores mostrados corresponden al valor medio del ratio de expresión de los genes inducidos tras el tratamiento con caspofungina (15 ng/ml) durante 2 horas de 3 experimentos independientes en los mutantes *slt2Δ* y *rlm1Δ*. Tomando como referencia los genes cuya expresión se incrementa en la cepa silvestre, estos se muestran distribuidos como dependientes o independientes de Slt2 siguiendo el criterio de análisis de datos descrito en Materiales y Métodos. Los puntos negros en la columna de la derecha identifican aquellos genes que muestran bloqueada su activación transcripcional en el mutante *rlm1Δ*.

Genes Slt2 dependientes

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>slt2Δ</i> CAS (+/-)	<i>rlm1Δ</i> CAS (+/-)		ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>slt2Δ</i> CAS (+/-)	<i>rlm1Δ</i> CAS (+/-)	
Pared celular						<i>YBR203W</i>	<i>COS111</i>	2,2	1,5	2,0	
<i>YKL163W</i>	<i>PIR3</i>	18,8	0,5	1,0	•	<i>YDR533C</i>	<i>HSP31</i>	2,2	1,5	1,8	
<i>YKR091W</i>	<i>SRL3</i>	7,3	1,3	1,2	•	Metabolismo de carbohidratos					
<i>YIR039C</i>	<i>YPS6</i>	3,2	1,3	1,5	•	<i>YPR160W</i>	<i>GPH1</i>	6,8	3,7	8,5	
<i>YKR061W</i>	<i>KTR2</i>	3,0	1,4	1,1	•	<i>YPL088W</i>	---	5,7	2,1	1,6	•
<i>YDR055W</i>	<i>PST1</i>	2,9	0,5	0,8	•	<i>YJL155C</i>	<i>FBP26</i>	2,5	1,2	1,3	•
<i>YLR121C</i>	<i>YPS3</i>	2,9	1,1	1,3	•	<i>YIL107C</i>	<i>PFK26</i>	2,0	1,2	1,3	•
<i>YJL160C</i>	<i>PIR5</i>	2,5	1,0	1,4	•	<i>YHR043C</i>	<i>DOG2</i>	2,0	1,0	1,4	•
<i>YKL104C</i>	<i>GFA1</i>	2,4	0,7	1,0	•	Otras funciones					
<i>YNL192W</i>	<i>CHS1</i>	2,1	1,4	1,5	•	<i>YDL181W</i>	<i>INH1</i>	2,3	1,6	2,3	
<i>YGR189C</i>	<i>CRH1</i>	2,1	0,9	1,2	•	<i>YHR209W</i>	<i>CRG1</i>	9,5	1,5	1,7	•
<i>YDR077W</i>	<i>SED1</i>	2,0	1,2	1,3	•	<i>YPL110C</i>	<i>GDE1</i>	2,2	1,1	1,1	•
Transporte						<i>YJL108C</i>	<i>PRM10</i>	6,0	3,5	3,8	•
<i>YCL069W</i>	<i>VBA3</i>	4,5	1,4	1,2	•	<i>YIL117C</i>	<i>PRM5</i>	4,3	1,1	1,0	•
<i>YIL023C</i>	<i>YKE4</i>	3,0	1,0	1,1	•	<i>YEL059C-A</i>	<i>SOM1</i>	2,1	1,4	1,3	•
<i>YDR342C</i>	<i>HXT6</i>	2,9	1,6	2,0		<i>YMR238W</i>	<i>DFG5</i>	2,0	1,2	1,1	•
<i>YNR065C</i>	---	2,9	1,1	0,8	•	<i>YPL052W</i>	<i>OAZ1</i>	2,0	1,1	1,1	•
<i>YNL293W</i>	<i>MSB3</i>	2,7	1,0	1,2	•	<i>YHL022C</i>	<i>SPO11</i>	2,5	1,3	1,6	•
<i>YAL053W</i>	<i>FLC2</i>	2,4	1,0	1,1	•	<i>YNL294C</i>	<i>RIM21</i>	2,2	1,0	1,0	•
<i>YNL015W</i>	<i>PBI2</i>	2,2	1,6	2,1		<i>YDR277C</i>	<i>MTH1</i>	2,2	1,5	2,3	
<i>YNR066C</i>	---	2,2	0,7	0,8	•	Función desconocida					
<i>YOR306C</i>	<i>MCH5</i>	2,1	0,9	0,7	•	<i>YDR070C</i>	<i>FMP16</i>	7,0	3,8	6,0	
<i>YHR092C</i>	<i>HXT4</i>	2,1	1,2	1,9		<i>YJL107C</i>	---	6,0	2,5	3,7	•
<i>YGR166W</i>	<i>TRS65</i>	2,1	0,9	1,0	•	<i>YJL161W</i>	<i>FMP33</i>	3,6	1,6	2,2	•
Transducción de señales						<i>YOL159C</i>	---	3,5	1,2	1,2	•
<i>YKL161C</i>	<i>KDX1</i>	14,9	1,0	1,0	•	<i>YPR078C</i>	---	3,5	1,3	1,0	•
<i>YDR085C</i>	<i>AFR1</i>	5,6	1,6	1,6	•	<i>YFL061W</i>	<i>DDI2</i>	3,0	1,4	1,8	•
<i>YMR104C</i>	<i>YPK2</i>	3,6	1,0	1,0	•	<i>YNL058C</i>	---	2,9	0,7	1,2	•
<i>YGR023W</i>	<i>MTL1</i>	2,7	1,3	1,5	•	<i>YIL029C</i>	---	2,4	1,6	1,8	
<i>YOR208W</i>	<i>PTP2</i>	2,7	1,3	1,2	•	<i>YBL049W</i>	<i>MOH1</i>	2,3	1,5	2,4	
<i>YHR030C</i>	<i>SLT2</i>	2,7	1,2	1,1	•	<i>YCR099C</i>	---	2,3	1,2	1,5	•
<i>YCR073C</i>	<i>SSK22</i>	2,3	1,0	0,8	•	<i>YPL067C</i>	---	2,2	1,1	1,4	•
<i>YPL089C</i>	<i>RLM1</i>	2,2	1,1	1,0	•	<i>YJL103C</i>	<i>GSM1</i>	2,2	1,6	2,2	
<i>YGL248W</i>	<i>PDE1</i>	2,0	1,4	1,4	•	<i>YIL108W</i>	---	2,1	1,1	1,1	•
Respuesta a estrés						<i>YCL049C</i>	---	2,1	1,1	1,1	•
<i>YFL014W</i>	<i>HSP12</i>	13,3	6,7	16,7		<i>YGL258W-A</i>	---	2,1	1,5	1,5	•
<i>YMR175W</i>	<i>SIP18</i>	10,5	4,2	5,7	•	<i>YGR149W</i>	---	2,0	1,4	1,6	
<i>YOL052C-A</i>	<i>DDR2</i>	7,0	3,6	6,5		<i>YDL057W</i>	---	2,0	1,3	1,8	
<i>YPR005C</i>	<i>HAL1</i>	2,5	1,3	1,7		<i>YNL115C</i>	---	2,0	1,3	1,5	•
<i>YCR104W</i>	<i>PAU3</i>	2,3	1,5	1,8							

Genes Slr2 independientes

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	slr2Δ CAS (+/-)	rlm1Δ CAS (+/-)	ORF	Gen	WT CAS (+/-)	slr2Δ CAS (+/-)	rlm1Δ CAS (+/-)
Respuesta a estrés					YFR053C	HXK1	2,6	1,7	2,5
YMR169C	ALD3	8,9	9,2	12,6	YLR258W	GSY2	2,4	2,0	2,2
YPL223C	GRE1	6,4	8,0	9,1	YOR120W	GXY1	2,2	2,0	1,9
YGR088W	CTT1	5,4	5,5	8,4	YPR001W	CIT3	2,2	1,9	2,3
YDR453C	TSA2	4,5	4,4	5,4	YIL099W	SGA1	2,2	2,8	3,0
YGR213C	RTA1	4,0	8,6	10,3	YGR087C	PDC6	2,1	3,7	2,9
YMR174C	PAI3	4,0	3,0	3,0	YER062C	GPP2	2,1	1,7	2,4
YIL101C	XBP1	3,2	3,2	3,5	YDL022W	GPD1	2,0	2,2	2,9
YBR072W	HSP26	3,2	3,0	4,3	Metabolismo de aminoácidos				
YMR095C	SNO1	3,0	5,3	3,9	YLR142W	PUT1	6,6	11,8	12,2
YGR144W	THI4	2,9	2,5	3,0	YBR117C	TKL2	6,3	4,7	6,7
YDL110C	TMA17	2,4	2,0	2,3	YDR380W	ARO10	5,6	8,3	9,7
YMR096W	SNZ1	2,4	3,0	2,4	YJL088W	ARG3	2,7	3,4	4,7
YDL243C	AAD4	2,3	3,0	3,4	YGL184C	STR3	2,7	5,1	6,2
YDR074W	TPS2	2,3	2,5	2,7	YHR137W	ARO9	2,6	2,7	3,0
YMR040W	YET2	2,2	3,3	2,9	YMR250W	GAD1	2,6	2,6	3,1
YMR322C	SNO4	2,1	2,2	2,4	YJR078W	BNA2	2,5	3,0	3,7
YML100W	TSL1	2,1	2,2	2,7	YKR076W	ECM4	2,3	2,5	2,4
YGR008C	STF2	2,1	2,4	2,7	YNL277W	MET2	2,3	3,2	3,1
YER037W	PHM8	2,0	2,2	3,6	Generación de energía				
YDR001C	NTH1	2,0	1,7	1,6	YAL061W	BDH2	5,6	5,8	7,7
Transporte					YDL085W	NDE2	3,7	3,4	3,0
YHR096C	HXT5	38,2	23,0	40,6	YOR374W	ALD4	3,3	3,7	3,6
YNR002C	ATO2	7,5	13,0	14,9	YML054C	CYB2	3,0	4,1	4,0
YDR536W	STL1	6,6	8,4	10,9	YPL171C	OYE3	2,8	2,9	3,3
YNL093W	YPT53	4,9	10,4	11,8	YDL130W-A	STF1	2,4	1,7	2,1
YOR348C	PUT4	3,8	4,7	5,6	YPR151C	SUE1	2,4	2,1	2,1
YGR243W	MPC3	3,8	3,1	4,1	Metabolismo de lípidos				
YPR194C	OPT2	2,9	2,2	3,3	YDL222C	FMP45	13,9	9,5	17,1
YBR294W	SUL1	2,9	6,5	4,5	YNL194C	---	11,1	12,9	21,8
YCR010C	ADY2	2,6	2,7	2,7	YGL205W	POX1	4,6	8,3	6,8
YKL217W	JEN1	2,6	3,6	3,5	YIL160C	POT1	2,8	3,5	2,5
YGR121C	MEP1	2,4	5,1	6,2	YNL202W	SPS19	2,3	2,0	2,4
YOR273C	TPO4	2,3	2,3	2,7	YHR160C	PEX18	2,2	3,1	2,8
YKR039W	GAP1	2,3	2,7	2,7	Otras funciones				
YOR100C	CRC1	2,3	2,2	2,0	YKL096W	CWP1	3,5	2,4	1,4
YLR417W	VPS36	2,0	2,6	2,3	YLR194C	---	2,6	2,0	1,6
Metabolismo de carbohidratos					YLR414C	PUN1	2,3	4,1	3,7
YJL153C	INO1	13,3	14,8	12,9	YER150W	SPI1	2,3	2,7	4,2
YGR256W	GND2	5,5	4,6	6,5	YGR032W	GSC2	2,2	2,9	2,9
YGR248W	SOL4	4,1	3,2	4,6	YDL223C	HBT1	3,8	3,1	4,0
YGL156W	AMS1	3,0	2,9	3,6	YBR230C	OM14	2,0	1,8	2,0
YMR105C	PGM2	2,8	2,6	2,7	YDL204W	RTN2	4,8	3,1	4,0
YEL011W	GLC3	2,6	3,0	3,2	YBL078C	ATG8	3,0	2,5	2,8

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>slt2Δ</i> CAS (+/-)	<i>rlm1Δ</i> CAS (+/-)	ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>slt2Δ</i> CAS (+/-)	<i>rlm1Δ</i> CAS (+/-)
YHR138C	---	2,1	2,9	2,7	YLR149C	---	2,9	3,1	4,0
YLR178C	TFS1	2,8	3,1	3,1	YBR085C-A	---	2,9	3,2	3,7
YEL060C	PRB1	2,1	2,3	2,3	YEL073C	---	2,8	3,1	3,3
YLL039C	UBI4	2,0	1,8	1,8	YDR018C	---	2,8	1,9	2,3
YDL024C	DIA3	3,9	4,9	6,3	YLR031W	---	2,7	2,8	3,0
YHR087W	RTC3	7,4	6,6	10,0	YHL021C	AIM17	2,7	4,2	4,2
YOR173W	DCS2	3,2	3,1	3,4	YOR161C	PNS1	2,6	2,3	2,3
YPL123C	RNY1	2,1	1,6	2,3	YMR196W	---	2,5	2,6	2,7
YGR043C	NQM1	10,6	12,2	16,3	YLR312C	---	2,5	1,9	2,7
YOR134W	BAG7	8,1	6,8	7,6	YMR090W	---	2,5	2,4	2,4
YGL121C	GPG1	3,8	2,8	4,0	YMR118C	SHH3	2,5	1,9	1,6
YDL214C	PRR2	2,7	2,9	4,0	YEL057C	---	2,4	2,3	2,7
YHR139C	SPS100	14,6	10,5	12,6	YML131W	---	2,4	1,8	2,3
YOL047C	LDS2	2,4	2,1	1,9	YOR289W	---	2,4	2,4	2,8
YOR177C	MPC54	2,2	2,1	2,1	YHR097C	---	2,3	3,0	3,2
YGR059W	SPR3	2,0	2,5	2,5	YKR046C	PET10	2,3	1,6	2,3
YIR017C	MET28	2,9	3,3	3,9	YBR076W	ECM8	2,2	2,2	1,9
YJL089W	SIP4	2,3	2,4	2,7	YBR056W-A	---	2,2	4,7	4,9
Función desconocida					YJR008W	MHO1	2,2	2,1	1,9
YMR107W	SPG4	18,6	18,0	22,5	YJL163C	---	2,1	2,0	2,3
YDR034W-B	---	14,3	16,1	31,7	YDL169C	UGX2	2,0	1,9	2,3
YOL084W	PHM7	8,4	9,2	13,6	YPL272C	PBI1	2,0	2,7	3,9
YGR052W	FMP48	5,7	8,5	15,2	YPR159C-A	---	2,0	2,4	2,1
YML128C	MSC1	5,6	6,1	8,0					
YBR285W	---	4,7	8,1	6,1					
YPL054W	LEE1	4,5	5,4	8,2					
YLR327C	TMA10	4,0	8,8	9,9					
YIL057C	RG12	3,9	4,2	3,3					
YLR267W	BOP2	3,8	4,8	6,1					
YNL195C	---	3,3	3,6	4,0					
YNR034W-A	---	3,3	2,5	4,0					
YGR066C	---	3,3	4,0	3,3					
YKL107W	---	3,2	3,6	2,9					
YHR140W	---	3,2	3,7	4,0					
YER067W	RG11	3,1	3,1	3,8					
YGR174W-A	---	3,1	2,3	2,8					

TABLA SUPLEMENTARIA 4. Comparación de los genes cuya expresión se induce en presencia de caspofungina en una cepa silvestre con la inducción observada en el doble mutante *msn2/4Δ*. Los valores mostrados corresponden al valor medio del ratio de expresión de los genes inducidos tras el tratamiento con caspofungina (15 ng/ml) durante 2 horas de 3 experimentos independientes en el doble mutante *msn2/4Δ*. Los genes marcados con un punto negro no se encuentran inducidos en el mutante *msn2/4Δ*. En la parte de los genes *Slr2* independientes, con asteriscos están señalados los genes previamente reportados (Orzechowski Westholm *et al*, 2012) cuya inducción se encuentra bloqueada en fase postdiáxica (crecimiento durante 9 horas en ausencia de glucosa) en el mutante *rph1Δ* (1) o *gis1Δ* (3), así como los dependientes en fase estacionaria (crecimiento en medio YPD durante 72 horas) de *Rph1* (2) y de *Gis1* (4).

Genes *Slr2* dependientes

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>msn2/4Δ</i> CAS (+/-)		ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>msn2/4Δ</i> CAS (+/-)	
Pared celular					<i>YBR203W</i>	<i>COS111</i>	2,2	1,7	
<i>YKL163W</i>	<i>PIR3</i>	18,8	19,2		<i>YDR533C</i>	<i>HSP31</i>	2,2	1,9	
<i>YKR091W</i>	<i>SRL3</i>	7,3	5,4		Metabolismo de carbohidratos				
<i>YIR039C</i>	<i>YPS6</i>	3,2	2,5		<i>YPR160W</i>	<i>GPH1</i>	6,8	3,0	•
<i>YKR061W</i>	<i>KTR2</i>	3,0	2,7		<i>YPL088W</i>	---	5,7	5,9	
<i>YDR055W</i>	<i>PST1</i>	2,9	2,5		<i>YJL155C</i>	<i>FBP26</i>	2,5	2,4	
<i>YLR121C</i>	<i>YPS3</i>	2,9	2,3		<i>YIL107C</i>	<i>PFK26</i>	2,0	1,9	
<i>YJL160C</i>	<i>PIR5</i>	2,5	2,2		<i>YHR043C</i>	<i>DOG2</i>	2,0	1,6	
<i>YKL104C</i>	<i>GFA1</i>	2,4	2,5		Otras funciones				
<i>YNL192W</i>	<i>CHS1</i>	2,1	2,0		<i>YDL181W</i>	<i>INH1</i>	2,3	2,6	
<i>YGR189C</i>	<i>CRH1</i>	2,1	1,9		<i>YHR209W</i>	<i>CRG1</i>	9,5	8,7	
<i>YDR077W</i>	<i>SED1</i>	2,0	1,8		<i>YPL110C</i>	<i>GDE1</i>	2,2	2,0	
Transporte					<i>YJL108C</i>	<i>PRM10</i>	6,0	4,8	
<i>YCL069W</i>	<i>VBA3</i>	4,5	4,8		<i>YIL117C</i>	<i>PRM5</i>	4,3	3,3	
<i>YIL023C</i>	<i>YKE4</i>	3,0	2,4		<i>YEL059C-A</i>	<i>SOM1</i>	2,1	1,7	
<i>YDR342C</i>	<i>HXT6</i>	2,9	1,3	•	<i>YMR238W</i>	<i>DFG5</i>	2,0	1,9	
<i>YNR065C</i>	---	2,9	2,8		<i>YPL052W</i>	<i>OAZ1</i>	2,0	2,1	
<i>YNL293W</i>	<i>MSB3</i>	2,7	2,2		<i>YHL022C</i>	<i>SPO11</i>	2,5	2,3	
<i>YAL053W</i>	<i>FLC2</i>	2,4	2,2		<i>YNL294C</i>	<i>RIM21</i>	2,2	1,9	
<i>YNL015W</i>	<i>PBI2</i>	2,2	2,1		<i>YDR277C</i>	<i>MTH1</i>	2,2	1,6	
<i>YNR066C</i>	---	2,2	1,5	•	Función desconocida				
<i>YOR306C</i>	<i>MCH5</i>	2,1	2,1		<i>YDR070C</i>	<i>FMP16</i>	7,0	2,8	•
<i>YHR092C</i>	<i>HXT4</i>	2,1	1,8		<i>YJL107C</i>	---	6,0	2,3	•
<i>YGR166W</i>	<i>TRS65</i>	2,1	2,2		<i>YJL161W</i>	<i>FMP33</i>	3,6	3,6	
Transducción de señales					<i>YOL159C</i>	---	3,5	3,1	
<i>YKL161C</i>	<i>KDX1</i>	14,9	11,5		<i>YPR078C</i>	---	3,5	3,5	
<i>YDR085C</i>	<i>AFR1</i>	5,6	3,9		<i>YFL061W</i>	<i>DDI2</i>	3,0	2,9	
<i>YMR104C</i>	<i>YPK2</i>	3,6	3,5		<i>YNL058C</i>	---	2,9	2,4	
<i>YGR023W</i>	<i>MTL1</i>	2,7	2,2		<i>YIL029C</i>	---	2,4	2,6	
<i>YOR208W</i>	<i>PTP2</i>	2,7	2,5		<i>YBL049W</i>	<i>MOH1</i>	2,3	2,2	
<i>YHR030C</i>	<i>SLT2</i>	2,7	2,4		<i>YCR099C</i>	---	2,3	2,7	
<i>YCR073C</i>	<i>SSK22</i>	2,3	2,2		<i>YPL067C</i>	---	2,2	2,0	
<i>YPL089C</i>	<i>RLM1</i>	2,2	1,8		<i>YJL103C</i>	<i>GSM1</i>	2,2	2,6	
<i>YGL248W</i>	<i>PDE1</i>	2,0	1,6		<i>YIL108W</i>	---	2,1	2,3	
Respuesta a estrés					<i>YCL049C</i>	---	2,1	1,7	
<i>YFL014W</i>	<i>HSP12</i>	13,3	28,5		<i>YGL258W-A</i>	---	2,1	1,8	
<i>YMR175W</i>	<i>SIP18</i>	10,5	2,7	•	<i>YGR149W</i>	---	2,0	1,9	
<i>YOL052C-A</i>	<i>DDR2</i>	7,0	3,8	•	<i>YDL057W</i>	---	2,0	1,8	
<i>YPR005C</i>	<i>HAL1</i>	2,5	2,6		<i>YNL115C</i>	---	2,0	1,9	
<i>YCR104W</i>	<i>PAU3</i>	2,3	3,0						

Genes Slt2 independientes

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>msn2/4Δ</i> CAS (+/-)	1	2	3	4	ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>msn2/4Δ</i> CAS (+/-)	1	2	3	4
Respuesta a estrés								<i>YFR053C</i>	<i>HXK1</i>	2,6	2,2				
<i>YMR169C</i>	<i>ALD3</i>	8,9	1,8	•	*	*	*	<i>YLR258W</i>	<i>GSY2</i>	2,4	1,6		*		
<i>YPL223C</i>	<i>GRE1</i>	6,4	3,9	•		*	*	<i>YOR120W</i>	<i>GCY1</i>	2,2	1,4	•	*	*	*
<i>YGR088W</i>	<i>CTT1</i>	5,4	1,2	•	*	*	*	<i>YPR001W</i>	<i>CIT3</i>	2,2	3,1		*	*	*
<i>YDR453C</i>	<i>TSA2</i>	4,5	1,9	•	*	*	*	<i>YIL099W</i>	<i>SGA1</i>	2,2	2,2				
<i>YGR213C</i>	<i>RTA1</i>	4,0	3,3					<i>YGR087C</i>	<i>PDC6</i>	2,1	2,9		*		
<i>YMR174C</i>	<i>PAI3</i>	4,0	2,2	•				<i>YER062C</i>	<i>GPP2</i>	2,1	2,0				
<i>YIL101C</i>	<i>XBP1</i>	3,2	2,8					<i>YDL022W</i>	<i>GPD1</i>	2,0	2,0				
<i>YBR072W</i>	<i>HSP26</i>	3,2	1,7	•				Metabolismo de aminoácidos							
<i>YMR095C</i>	<i>SNO1</i>	3,0	2,9		*		*	<i>YLR142W</i>	<i>PUT1</i>	6,6	6,2		*		
<i>YGR144W</i>	<i>THI4</i>	2,9	3,2			*		<i>YBR117C</i>	<i>TKL2</i>	6,3	1,6	•			
<i>YDL110C</i>	<i>TMA17</i>	2,4	2,6					<i>YDR380W</i>	<i>ARO10</i>	5,6	3,9				*
<i>YMR096W</i>	<i>SNZ1</i>	2,4	2,4		*		*	<i>YJL088W</i>	<i>ARG3</i>	2,7	2,1		*		
<i>YDL243C</i>	<i>AAD4</i>	2,3	2,4					<i>YGL184C</i>	<i>STR3</i>	2,7	3,0				
<i>YDR074W</i>	<i>TPS2</i>	2,3	1,8					<i>YHR137W</i>	<i>ARO9</i>	2,6	2,3				*
<i>YMR040W</i>	<i>YET2</i>	2,2	2,8					<i>YMR250W</i>	<i>GAD1</i>	2,6	2,1				
<i>YMR322C</i>	<i>SNO4</i>	2,1	2,5			*	*	<i>YJR078W</i>	<i>BNA2</i>	2,5	1,3	•	*		
<i>YML100W</i>	<i>TSL1</i>	2,1	1,8					<i>YKR076W</i>	<i>ECM4</i>	2,3	1,8		*	*	*
<i>YGR008C</i>	<i>STF2</i>	2,1	2,4			*	*	<i>YNL277W</i>	<i>MET2</i>	2,3	2,9		*		
<i>YER037W</i>	<i>PHM8</i>	2,0	2,9					Generación de energía							
<i>YDR001C</i>	<i>NTH1</i>	2,0	2,4		*			<i>YAL061W</i>	<i>BDH2</i>	5,6	2,9	•	*	*	*
Transporte								<i>YDL085W</i>	<i>NDE2</i>	3,7	2,8		*		
<i>YHR096C</i>	<i>HXT5</i>	38,2	12,7	•				<i>YOR374W</i>	<i>ALD4</i>	3,3	4,0			*	*
<i>YNR002C</i>	<i>ATO2</i>	7,5	9,6		*	*		<i>YML054C</i>	<i>CYB2</i>	3,0	2,5		*	*	*
<i>YDR536W</i>	<i>STL1</i>	6,6	4,0	•				<i>YPL171C</i>	<i>OYE3</i>	2,8	2,0		*	*	*
<i>YNL093W</i>	<i>YPT53</i>	4,9	3,0	•	*			<i>YDL130W-A</i>	<i>STF1</i>	2,4	2,2		*	*	
<i>YOR348C</i>	<i>PUT4</i>	3,8	2,7					<i>YPR151C</i>	<i>SUE1</i>	2,4	3,1				
<i>YGR243W</i>	<i>MPC3</i>	3,8	5,6				*	Metabolismo de lípidos							
<i>YPR194C</i>	<i>OPT2</i>	2,9	1,5	•				<i>YDL222C</i>	<i>FMP45</i>	13,9	6,5	•			*
<i>YBR294W</i>	<i>SUL1</i>	2,9	7,8					<i>YNL194C</i>	---	11,1	3,6	•	*	*	*
<i>YCR010C</i>	<i>ADY2</i>	2,6	4,3			*	*	<i>YGL205W</i>	<i>POX1</i>	4,6	12,5				
<i>YKL217W</i>	<i>JEN1</i>	2,6	3,1					<i>YIL160C</i>	<i>POT1</i>	2,8	4,1				*
<i>YGR121C</i>	<i>MEP1</i>	2,4	2,1					<i>YNL202W</i>	<i>SPS19</i>	2,3	3,0				*
<i>YOR273C</i>	<i>TPO4</i>	2,3	2,9			*		<i>YHR160C</i>	<i>PEX18</i>	2,2	3,6				*
<i>YKR039W</i>	<i>GAP1</i>	2,3	2,1			*		Otras funciones							
<i>YOR100C</i>	<i>CRC1</i>	2,3	3,3			*	*	<i>YKL096W</i>	<i>CWP1</i>	3,5	4,1				
<i>YLR417W</i>	<i>VPS36</i>	2,0	2,1			*		<i>YLR194C</i>	---	2,6	2,1				
Metabolismo de carbohidratos								<i>YLR414C</i>	<i>PUN1</i>	2,3	2,1				
<i>YJL153C</i>	<i>INO1</i>	13,3	18,2			*		<i>YER150W</i>	<i>SPI1</i>	2,3	2,4		*	*	
<i>YGR256W</i>	<i>GND2</i>	5,5	3,1	•	*	*	*	<i>YGR032W</i>	<i>GSC2</i>	2,2	2,4				
<i>YGR248W</i>	<i>SOL4</i>	4,1	1,5	•	*	*	*	<i>YDL223C</i>	<i>HBT1</i>	3,8	2,0	•			*
<i>YGL156W</i>	<i>AMS1</i>	3,0	2,7		*	*	*	<i>YBR230C</i>	<i>OM14</i>	2,0	1,6				
<i>YMR105C</i>	<i>PGM2</i>	2,8	1,9					<i>YDL204W</i>	<i>RTN2</i>	4,8	1,5	•			
<i>YEL011W</i>	<i>GLC3</i>	2,6	2,1		*	*		<i>YBL078C</i>	<i>ATG8</i>	3,0	2,5				*

Anexos

ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>msn2/4Δ</i> CAS (+/-)	1	2	3	4	ORF	Gen	WT CAS (+/-)	<i>msn2/4Δ</i> CAS (+/-)	1	2	3	4
YHR138C	---	2,1	2,3					YLR149C	---	2,9	3,5				
YLR178C	TFS1	2,8	2,0		*	*		YBR085C-A	---	2,9	2,9	*			
YEL060C	PRB1	2,1	1,9		*	*		YEL073C	---	2,8	3,1				
YLL039C	UBI4	2,0	3,5		*	*	*	YDR018C	---	2,8	1,8				*
YDL024C	DIA3	3,9	2,3	•	*			YLR031W	---	2,7	3,4				
YHR087W	RTC3	7,4	10,3		*		*	YHL021C	AIM17	2,7	2,0	*	*		
YOR173W	DCS2	3,2	2,1					YOR161C	PNS1	2,6	1,6	•			
YPL123C	RNY1	2,1	2,0					YMR196W	---	2,5	2,2	*	*	*	*
YGR043C	NQM1	10,6	7,4					YLR312C	---	2,5	3,4				
YOR134W	BAG7	8,1	5,5		*		*	YMR090W	---	2,5	1,6		*	*	*
YGL121C	GPG1	3,8	4,3		*	*		YMR118C	SHH3	2,5	3,8			*	*
YDL214C	PRR2	2,7	2,2					YEL057C	---	2,4	2,4				
YHR139C	SPS100	14,6	6,7	•	*		*	YML131W	---	2,4	2,5		*		
YOL047C	LDS2	2,4	2,1					YOR289W	---	2,4	2,7				
YOR177C	MPC54	2,2	2,1		*			YHR097C	---	2,3	1,8	*			
YGR059W	SPR3	2,0	1,9					YKR046C	PET10	2,3	2,3		*	*	*
YIR017C	MET28	2,9	3,4					YBR076W	ECM8	2,2	2,4				
YJL089W	SIP4	2,3	3,5					YBR056W-A	---	2,2	1,5	•			
Función desconocida								YJR008W	MHO1	2,2	2,5				
YMR107W	SPG4	18,6	15,5		*		*	YJL163C	---	2,1	1,9				
YDR034W-B	---	14,3	12,3					YDL169C	UGX2	2,0	2,2	*		*	*
YOL084W	PHM7	8,4	3,1	•			*	YPL272C	PBI1	2,0	2,3				
YGR052W	FMP48	5,7	4,1		*		*	YPR159C-A	---	2,0	1,7				
YML128C	MSC1	5,6	3,0	•	*		*								
YBR285W	---	4,7	4,1			*	*								
YPL054W	LEE1	4,5	3,6												
YLR327C	TMA10	4,0	8,6		*	*									
YIL057C	RGI2	3,9	8,3				*								
YLR267W	BOP2	3,8	4,6												
YNL195C	---	3,3	1,3	•											
YNR034W-A	---	3,3	1,8	•											
YGR066C	---	3,3	5,0		*	*									
YKL107W	---	3,2	4,9			*	*								
YHR140W	---	3,2	2,4			*	*								
YER067W	RGI1	3,1	1,6	•											
YGR174W-A	---	3,1	3,5		*		*								